UNIVERSITE DE DIJON

INSTITUT DE BIOLOGIE APPLIQUEE A LA NUTRITION ET A L'ALIMENTATION

Laboratoire de Microbiologie

THESE

présentée à la Faculté de Sciences en vue d'obtenir

le grade de DOCTEUR-INGENIEUR

par

Nicole GOËTZ

Ingénieur I. B. A. N. A.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MICROFLORE DU FROMAGE D'EPOISSES

Soutenue le 19 Septembre 1974

devant la Commission d' Examen

Président	M. J. KEILLING
Examinateurs	M. C. BARON
	M. R. BESSIS
	M. V. CAUMARTIN

(N° C.N.R.S. n° A.O. 10.256)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549827_0017

UNIVERSITE DE DIJON

INSTITUT DE BIOLOGIE APPLIQUEE A LA NUTRITION ET A L'ALIMENTATION

Laboratoire de Microbiologie

****

THESE

présentée à la Faculté de Sciences en vue d'obtenir

le grade de DOCTEUR-INGENIEUR

par

Nicole G O Ë T Z

Ingénieur I. B. A. N. A.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MICROFLORE DU FROMAGE D'EPOISSES

Soutenue le 19 Septembre 1974

devant la Commission d' Examen

****

Président	M. J. KEILLING
Examinateurs	M. C. BARON
	M. R. BESSIS
	M. V. CAUMARTIN

(N* C.N.R.S. n* A.O. 10.256)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma mère,

en témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance pour toutes les études qui ont précédé ce travail.

A ma filleule, Stéphanie

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'IBANA, dirigé par Monsieur le Professeur CAUMARTIN.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance à Monsieur V. CAUMARTIN pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire et pour les précieux conseils dont il m'a fait bénéficier avec une inlassable bienveillance.

Monsieur J. KEILLING, Professeur à l'INA, Directeur de l'IBANA, m'a fait l'honneur d'accepter la Présidence du Jury de cette thèse. Qu'il me soit permis de lui adresser l'expression de ma sincère admiration et de mon profond respect.

Monsieur C. BARON, Professeur à l'Université de DIJON, a bien voulu s'intéresser à mes recherches et juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes respectueux remerciements.

Monsieur R. BESSIS, Professeur à l'Université de DIJON, Directeur du Département de Biologie Appliquée de l'I.U.T., a accepté de faire partie de mon Jury de thèse. Qu'il veuille bien croire à l'expression de ma respectueuse gratitude pour la confiance et les responsabilités qu'il ma toujours accordées dans le domaine de l'Enseignement.

Monsieur R. BERTHAUD, Fromager à EPOISSES, a gracieusement mis à ma disposition les échantillons nécessaires à la réalisation de ce mémoire. Je lui exprime mes plus vifs remerciements.

Que tous ceux qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de mon amicale et très sincère reconnaissance.

-!-!-!-!-!-!-!-!-

S O M M A I R E

pages

INTRODUCTION

I Objet du travail 1
II Pourquoi avoir choisi le fromage d'Epoisses 1
III Plan du travail 1
IV Intérêt de ce type de recherche sur le plan technologique 2

CHAPITRE I

LE FROMAGE : SES TITRES DE NOBLESSE

I Les origines du fromage 3
II Les fromages dans le monde 3
III Ce qu'il importe de connaître 4

CHAPITRE II

APERCU DES MECANISMES INTIMES DE L'AFFINAGE DES FROMAGES

I Introduction 5
II Les agents de la maturation des fromages 6

1 - les enzymes naturelles du lait 6
2 - la présure 7
3 - les microorganismes 9
4 - les enzymes microbiennes 9

a) les protéases 10
b) les lipases 10
c) les désaminases et transaminases 10
d) les décarboxylases 11
e) les phosphatases 11

CHAPITRE III

LE FROMAGE D'EPOISSES

pages

A - ORIGINE ET CARACTERISTIQUES

I Les origines 12
II Le milieu 12
III Le développement 14
IV Les caractéristiques physiques 15

B - FABRICATION

I Généralités 16
II Techniques fromagères 17

1 - le lait 18
2 - coagulation et égouttage du caillé 18
3 - salage 20
4 - maturation et affinage 21

CHAPITRE IV

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE D'EPOISSES : SON EVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION

I Introduction 22
II Protocole expérimental 23

1 - Analyse microbiologique du fromage 23

a) préparation de l'échantillon 23
b) dénombrement de la flore totale 24
c) dénombrement des Streptocoques 24
d) dénombrement des Lactobacilles 24
e) recherche et dénombrement des bactéries coliformes 24
f) dénombrement des levures 24
g) dénombrement des microcoques et autres bactéries halophiles 24

2 - Analyse chimique du fromage 25

a) mesure du pH 25
b) teneur en matière sèche 25
c) évolution du poids 25
d) dosage du NaCl 25

pages

. principe 26
. dosage 26

III RESULTATS

1 - Caractéristiques chimiques et courbes s'y rapportant 26

a) teneur en matière sèche et évolution du poids 27
b) teneur en NaCl 29
c) évolution du pH 30

2 - Dénombrements des différentes microflores et courbes correspondantes 32

a) microflore totale 34
b) streptocoques 35
c) lactobacilles 36
d) levures 37
e) microcoques et halophiles 38

IV - DISCUSSION DES RESULTATS 41

1 - Microflore totale 41
2 - Streptocoques 41
3 - Lactobacilles 42
4 - Levures 42
5 - Microcoques 43
6 - Coliformes 43
7 - Remarques et conclusions 43

CHAPITRE V

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE D'EPOISSES : SES ESPECES DOMINANTES

I Introduction 46
II Protocole expérimental 46

1 - Isolement des souches 46
2 - Caractérisation des souches 47

a) streptocoques 47
b) lactobacilles 48

pages

API SYSTEM LACTOBACILLUS 48

. matériel 48
. principe 49
. mode opératoire 49
. lecture des caractères 51
. interprétation des résultats 56

c) microcoques et autres bactéries halophiles 56
d) levures 59

III Résultats et interprétation 65

1 - Streptocoques 65
2 - Lactobacilles 68
3 - Microcoques et autres bactéries halophiles 70
4 - Levures 72

IV Discussion des résultats 75

CHAPITRE VI

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES DU SALAGE DES FROMAGES EN SAUMURE

I Aspects physico-chimiques du salage en saumure 77

1 - Migration du lactosérum 78
2 - Migration du calcium 78
3 - Migration d'autres minéraux 79
4 - Migration des matières azotées et du lactose 79
5 - Migration du sel 79

II Aspects microbiologiques du salage en saumure 80

1 - Origine des sels et importance de leur flore bactérienne 80
2 - Microbiologie des sels et des saumures 81

a) apports dus au sel 81

. bactéries chromogènes halophiles du "rouge" 81
. bacillaceae 82
. micrococcaceae 82
. enterobacteriaceae 83

pages

b) apports dus à l'eau 83
c) apports dus aux fromages 84
d) apports dus à l'environnement 84

III Aspects microbiologiques de la saumure d'Epoisses 86

1 - Schéma de l'analyse microbiologique 86

a) dénombrement de la flore totale aérobie mésophile 86
b) recherche des coliformes totaux 86
c) dénombrement des levures et moisissures 86
d) recherche des streptocoques fécaux 86
e) dénombrement des anaérobies totaux sporulés 87
f) recherche des formes végétatives et spores de Clostridia sulfito-réducteurs 87
g) dénombrement des staphylocoques et autres bactéries halophiles 87

2 - Résultats 87
3 - Discussion des résultats 88
4 - Systématique des quelques souches pigmentées isolées de la saumure 88
5 - Conclusion 92

IV Accidents de saumurage d'origine microbienne 92

CHAPITRE VII

ASPECTS TECHNOLOGIQUES

I Introduction 94
II Qualité du lait à l'entrée 95
III Conditionnement des salles d'égouttage 96
IV Conditionnement des salles de salage et problèmes posés par le salage en saumure 99
V Conditionnement des salles de ressuyage avant entrée au haloir 103
VI Conditionnement des haloirs et des caves d'affinage 105

CONCLUSION GENERALE 109

BIBLIOGRAPHIE 114

I N T R O D U C T I O N

I OBJET DU TRAVAIL

Etant donné qu'il n'existe, à notre connaissance aucune publication scientifique sur la microbiologie du fromage d'Epoisses et que la production de ce fromage augmente d'année en année, il nous est apparu intéressant d'étudier plus en détail la population microbienne de ce produit alimentaire très apprécié des consommateurs.

II POURQUOI AVOIR CHOISI LE FROMAGE D'EPOISSES ?

La réputation ancienne et actuelle, l'originalité du terroir, l'utilisation de lait cru et entier, la fabrication artisanale de ce fromage, sont autant de critères qui ont motivé notre choix.

Les fromages de réputation gastronomique mondiale (Roquefort, Saint-Paulin, Camembert, etc...) ont débuté par une phase empirique de fabrication ; les aspects technologiques n'ont été envisagés qu'après des siècles de consécration. L'Epoisses est, parmi quelques sortes de fromages, un de ceux qui n'ont pas encore subi l'industrialisation, ce qui permet d'essayer de saisir les mécanismes d'un processus d'affinage naturel.

III PLAN DU TRAVAIL

Dans un premier temps, nous avons déterminé la microflore de ce fromage et suivi son évolution tout au long de la maturation.

Afin de compléter cette étude, essentiellement quantitative, il nous a paru utile de déterminer quelles étaient les espèces microbiennes les plus représentatives de chacun des groupes dénombrés.

Nous nous sommes également intéressés aux problèmes posés par le salage en saumure. L'importance de cette opération découle de ses effets multiples (sélection de la microflore naturelle, ensemencement par une flore halophile sélectionnée par voie spontanée, etc...). Etant donné les nombreux échanges qui s'opèrent entre fromage et saumure, nous avons suivi l'évolution microbiologique de cette dernière, la qualité du fromage et celle de la saumure dépendant étroitement de la flore microbienne.

Le nombre important de souches pigmentées isolées de la saumure et de la morge du fromage en fin d'affinage nous a conduit à faire une identification de ces espèces microbiennes, originales dans l'ensemble et responsables de la pigmentation spontanée de ce fromage.

IV INTERET SUR LE PLAN TECHNOLOGIQUE DE CE TYPE DE RECHERCHE

Nous sommes en présence d'un affinage purement biologique et notre but est de mettre en évidence les principales phases microbiologiques responsables de cette maturation.

Nous pourrons, alors, aborder dans un second temps, les aspects biochimiques et envisager un ensemencement par une microflore sélectionnée.

Néanmoins, ceci nécessite une parfaite connaissance des paramètres de l'affinage et la maîtrise de ces paramètres ; or, la maturation d'un fromage, nous le verrons, est un processus extrêment complexe.

CHAPITRE I

LE FROMAGE : SES TITRES DE NOBLESSE

I LES ORIGINES DU FROMAGE

Nul ne sait quand fut fabriqué le premier fromage. Son origine se perd dans la nuit des temps ; l'on peut fort bien imaginer que les premiers hommes en consommèrent, même si ce produit se présentait alors sous une forme brute, infiniment moins alléchante que les spécialités offertes à l'étalage d'un fromager du XXème siècle.

Les Grecs nommaient FORMOS le panier d'osier dans lequel ils plaçaient le fromage. Les Romains en tirèrent le mot FORMA qui devient "formage" en vieux français, puis "fromage".

Selon toute probalité, l' inventeur du fromage n'est autre que... lui-même. La raison tend à le prouver, en s'appuyant sur une expérience que personne n'ignore : le lait, abandonné à l'air, s'ensemence naturellement, coagule et fermente. Les techniciens modernes se bornent, en fait à respecter ce processus de fabrication. Ils tentent simplement de guider, de modifier et parfois de stopper l'action des microbes.

II LES FROMAGES DANS LE MONDE

On reconnaît volontiers qu'au point de vue "gastronomie fromagère" les moines ont droit à la reconnaissance des hommes. On leur doit la mise au point des grands fromages du monde : leur vie communautaire, leur organisation sociale et agricole et aussi -tant mieux- leur gourmandise bien naturelle nous ont donné des produits aussi succulents

que le Munster (déformation du mot "monastère"), le Livarot, le Pont-l'Evêque, le Port-Salut, le Saint-Paulin, l'Epoisses et tant d'autres...

Tous les pays du monde possèdent les fromages que leur climat, leur sol ou leurs conditions de vie permettent.

L'Europe Occidentale est évidemment privilégiée sur la plan de la qualité : ses riches pâturages lui permettent une merveilleuse variété de fromages affinés (77). Le Français en mange d'ailleurs 9,2 kg par an, suivi par le Norvégien (9kg), le Danois (8,6 kg), le Suisse (8kg), le Suédois (7,9kg), le Hollandais (7,8kg), l'Italien (7,5kg), l'Allemand (7,2kg), et le Belge.

III CE QU'IL IMPORTE DE CONNAITRE

On a fait, au cours des siècles, du fromage avec le lait de nombreux mammifères : ânesse, bufflonnesse etc... On admet que la qualité, la richesse et le parfum de leur lait dépendent surtout des pâturages, c'est dire quelle importance peut avoir le terroir dans la saveur et la tenue d'un fromage. Mais, à l'heure actuelle, cette notion de terroir n'a plus la même valeur, les aires de production dépassant très largement les aires d'origine.

En ce qui concerne l'Epoisses, notre but est de mieux connaître les mécanismes biologiques qui entrent en jeu et donnent un cachet tout particulier à ce fromage. Nous pourrions, alors, dans une étude ultérieure, nous intéresser aux paramètres qui définissent cette notion de terroir, ceci étant encore chose possible pour ce type de fromage.

C H A P I T R E II

APERCU DES MECANISMES INTIMES DE L'AFFINAGE DES FROMAGES

I INTRODUCTION

Au cours de la coagulation ou de l'égouttage, tous les fromages sont le siège d'au moins une fermentation, la fermentation lactique. Aussi, la distinction populaire, et même réglementaire, entre fromages fermentés et non fermentés est sans signification. Ce qui varie d'un type de fromage à l'autre, ce n'est donc pas l'existence ou non d'une fermentation, mais la nature et l'importance des transformations biochimiques qui peuvent se produire au sein des caillés après l'égouttage.

En effet, la fabrication des fromages, les pâtes fraîches de type suisse ou demi-sel exceptées, s'achève toujours par une phase d'affinage ou de maturation. Cette phase d'affinage modifie l'aspect, la couleur, mais surtout la digestibilité et la valeur nutritive. Simultanément, la saveur et l'arôme se développent. Le fromage acquiert ses caractères typiques propres.

Le processus d'affinage est extrêmement complexe, en raison, d'abord de la composition du substrat. Tous les constituants du caillé sont concernés ou interviennent.

Les composants énergétiques, glucides, lipides, protides, sont plus ou moins dégradés ; les autres composants, eau, éléments minéraux, vitamines, influent sur la marche du phénomène en agissant sur l'activité des enzymes ou sur le développement des microorganismes. Le phénomène est compliqué en raison, aussi, de la grande variété des agents responsables, microbes et enzymes, de la diversité des modifications subies par les constituants du caillé et, par suite, du très grand nombre de produits formés.

Si le processus de maturation est complexe lorsqu'on envisage un type donné de fromage, il l'est encore bien davantage lorsqu'on se réfère à toutes les variétés existantes, car chacune présente un mode d'affinage qui lui est propre. Toutefois, d'une manière générale, cette évolution est dominée par trois grands phénomènes biochimiques :

- la fermentation du lactose,
- l'hydrolyse de la matière grasse,
- la dégradation des protéines.

Ce sont ces transformations qui modifient la texture du caillé et qui, par leurs produits terminaux, sont à l'origine de la saveur et de l'arôme du fromage mûr.

II LES AGENTS DE LA MATURATION DES FROMAGES

La maturation est un phénomène biologique ; ses agents sont les enzymes naturelles du lait, la présure et les microorganismes qui peuplent les pâtes ; mais le rôle et l'importance respectifs de ces divers agents restent difficiles à préciser.

1 - Les enzymes naturelles du lait

Certaines enzymes du lait sont entraînées dans le caillé avec la caséine ou la matière grasse. Elles peuvent donc agir au cours de l'affinage des fromages de lait cru (ex : Epoisses) et divers auteurs ont, dans le passé attribué à ces enzymes un rôle important.

Il y a tout d'abord la protéase naturelle qui, dans le lait, est associée à la caséine. Certains auteurs comme BABCOCK et RUSSEL (1896) lui attribuaient l'action fondamentale de décomposition de la caséine, les fromages préparés aseptiquement s'affinant comme les autres. Mais, l'argument vaut aussi pour invoquer l'action de la présure et, actuellement, bien que la protéase du lait reste un système enzymatique mal connu, il est admis que son intervention ne peut guère être significative au cours de l'affinage car son pH optimal d'activité (8,5) se situe dans une zône éloignée du pH des pâtes fromagères (5 en général).

Les lipases, en revanche, pourraient agir; tout au moins dans certains types de pâtes. L'activité optimale des lipases se situe également dans la zône alcaline (pH 8,5-9,0), mais, aux pH acides, 5 à 6, l'activité lipasique reste encore appréciable. Ainsi, les lipases seraient en mesure d'intervenir dans les pâtes fermes dont le pH est de l'ordre de 5-5,5. En fait, le rôle des lipases du lait reste difficile à définir. La stabilité de l'enzyme, sa thermorésistance, ses possibilités de réactivation sont mal connues ; en outre, les concentrations du lait en enzymes sont extrêmement variables d'un animal à l'autre et d'un jour à l'autre ; elles sont normalement faibles, heureusement d'ailleurs, pour les autres fabrications et pour la simple conservation du lait.

L'action d'autres enzymes naturelles n'a guère été envisagée. Peut-être faut-il cependant faire une part à la phosphatase alcaline. Son pH optimal (4,2-4,7 selon les auteurs), sa thermorésistance élevée, son activité appréciable sur les liaisons esters phosphoriques de la caséine peuvent lui permettre de jouer un rôle notable ; la caséine, après déphophorylation serait plus réactive et pourrait être plus facilement hydrolysée par les enzymes protéolytiques.

Finalement, il semble bien que les actions des enzymes naturelles du lait, si elles existent (elles sont pour la plupart inhibées par pasteurisation), ne peuvent être que limitées ; elles sont très faibles par comparaison avec les actions des enzymes d'origine microbienne.

2- La présure

Elle agit comme une endopeptidase attaquant les polypeptides ou les protéines en mileu de chaîne, sans altérer les groupes terminaux.

Elle exerce une double action sur la caséine. Dans la phase de préparation du caillé, elle exerce une action coagulante . Cette action est très spécifique, elle est liée à l'hydrolyse d'une seule liaison sur le composant du complexe responsable de la stabilité des micelles, la caséine

kappa. Par la suite, au cours de l'affinage, elle exerce une action de protéolyse de type endopeptidasique sur toutes les protéines du caillé.

La présure est très stable aux pH 5 à 6; au-dessus de pH 6, son activité diminue progressivement et au-delà de pH 7, elle est dénaturée. Elle présente une activité optimale à pH 4,6 sur la caséine entière, aux environs de pH 5,5 sur la caséine kappa.

La part de la présure dans la dégradation des protéines du caillé est difficile à préciser car elle n'agit pas isolément, mais en association avec les protéases d'origine microbienne. Il est cependant sûr qu'elle intervient dans le processus de l'affinage et, pour certains types de pâtes, son rôle est probablement important. La stabilité de l'enzyme et son pH optimal lui permettent d'intervenir dans la zône de pH 5 - 5,5 ; de même, on peut observer qu'une addition supplémentaire de présure au caillé entraîne une protéolyse plus prononcée.

Il est également établi que l'action de la présure sur la caséine se traduit par la libération de macromolécules de type polypeptide et non d'acides aminés. Les substances ainsi formées pourront cependant être reprises par les enzymes microbiennes et amenées au stade de molécules simples. La présure aurait donc sur le développement de la saveur et de l'arôme une influence assez faible mais, indirectement, en formant des produits intermédiaires, son rôle peut être important.

Il a d'ailleurs été remarqué que l'action d'une association présure-protéases microbiennes est souvent plus grande que ne l'est la somme des actions des agents isolés ; l'activité de la présure peut être favorisée par la présence des autres enzymes ; ou bien, les protéases microbiennes peuvent, elles-mêmes, être plus actives sur une caséine préalablement modifiée par action de la présure que sur une caséine native.

3 - Les microorganismes

Les fromages constituent le type même de "l'aliment microbien". Un très grand nombre de microorganismes, appartenant à des espèces variées, y vivent, y pullulent, y meurent; en outre, le rôle des microbes, de leurs productions et de leurs sécrétions y est prépondérant. Par ailleurs, dans un fromage en cours de maturation, il n'y a pas un équilibre microbien stable, on observe très fréquemment une véritable succession de flores ; certaines espèces, certains groupes se développement activement, d'autres restent présents en nombres constants, d'autres enfin s'atténuent et peu à peu disparaissent.

La diversité de la flore et son évolution dans le temps contribuent à la complexité du processus de maturation et cela, d'autant plus que, dans un fromage, les effets d'association, de symbiose ou, au contraire, d'antibiose seront fréquents.

Chaque type de fromage est caractérisé par une microflore qui lui est propre et nous verrons, dans un chapitre ultérieur, celle concernant le fromage d'Epoisses.

4 - Les enzymes microbiennes

Les proliférations bactériennes, la lyse des cellules et les successions de flores superficielles dans les fromages à pâte molle laissent supposer que les enzymes microbiennes, tant intracellulaires qu'extracellulaires, jouent un rôle prépondérant dans l'affinage. A vrai dire, trop peu de travaux ont été consacrés à l'étude de ces enzymes pour qu'il soit possible de définir exactement la part qui leur revient dans la maturation des pâtes.

Deux groupes d'enzymes microbiennes sont particulièrement importants : les protéases et les lipases (3) ; doivent être également mentionnées, les décarboxylases et les désaminases ainsi que les phosphatases.

-a) les protéases

La plupart des microorganismes produit des protéases mais ils le font à des degrés très divers. Les espèces dites protéolytiques produisent des protéases extracellulaires donc capables d'agir sur les protéines du milieu ; les espèces peu ou pas protéolytiques à l'état vivant possèdent des protéases intracellulaires qui ne peuvent être libérés et, par suite, agir qu'après la mort de la cellule. Les premières jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages à pâte molle qui s'effectue en quelques semaines. Les secondes sont, pour l'essentiel, responsables de la maturation des fromages à pâte ferme qui demande plusieurs mois.

Parmi les principaux groupes microbiens producteurs de protéases, il convient de signaler en premier lieu les moisissures du genre Penicillium (*P. caseicolum et P. roqueforti*). Dans le groupe des levures, certaines espèces produisent des protéases extracellulaires (genre Candida). On reconnait également depuis longtemps aux Microcoques une activité protéolytique importante (22,23) et il a pu être observé qu'environ 1/5 des souches isolées de fromage en voie de maturation étaient aptes à digérer rapidement la caséine.

-b) les lipases

L'aptitude à produire les lipases est extrêmement variable d'une espèce à l'autre (3). Dans les fromages, les principales sources de lipases sont les moisissures, les levures, les bactéries psychrotrophes, les microcoques.

-c) les désaminases et transaminases

sont des enzymes qui, au regard de la maturation des fromages, ont été peu étudiées. On sait, cependant que de nombreux microorganismes possèdent de telles enzymes, par exemple : certains Streptocoques lactiques et lactobacilles,les Streptocoques du groupe D, quelques microcoques. Leur présence a été décelée dans plusieurs fromages

notamment dans les pâtes molles. Les modifications des acides aminés dont elles sont responsables concourrent puissament au développement de l'arôme et de la saveur.

-d) les décarboxylases,

à l'origine de la formation d'amines à partir de certains acides aminés, sont présentes chez certaines espèces bactériennes , lactobacilles, bactéries coliformes, Bacillus... Une décarboxylase active sur la tyrosine a été notamment mise en évidence avec *Streptococcus faecalis* (81). Elles sont présentes et interviennent dans toutes les pâtes fromagères, plus particulièrement dans les pâtes molles.

-e) les phosphatases

sont secrétées par de nombreux microorganismes notamment par les moisissures, à un moindre degré, par les Bacillus et, en quantité plus faible, par certaines espèces de microcoques et de bactéries lactiques.

Dans la mesure où la maturation est l'oeuvre d'enzymes, dont une part importante est d'origine microbienne, tous les facteurs susceptibles d'agir sur le développement des microorganismes et sur la production d'enzymes, ainsi que sur l'activité de celles-ci, joueront évidemment un rôle important au cours de l'affinage. Nous n'insisterons pas ici sur l'influence de divers facteurs qui peuvent intervenir ; signalons simplement qu'en agissant sur l'aération du fromage, la température et l'état hygrométrique des locaux, l'humidité, la teneur en sel et le pH des pâtes, le fromager peut orienter et diriger les actions microbiennes en enzymatiques et, par là même, contrôler l'affinage.

CHAPITRE III

LE FROMAGE D'EPOISSES

A - ORIGINE ET CARACTERISTIQUES

I LES ORIGINES

De création fort ancienne, probablement bénédictine ou cistercienne (les laitages étant tolérés dans l'alimentation des religieux relevant de la règle de Saint-Benoît), le fromage d'Epoisses est sans conteste possible, l'un des plus anciens produits du sol de Bourgogne.

De temps immémorial les foires et les marchés en furent le lieu d'approvisionnement dans la région privilégie d'où il est originaire.

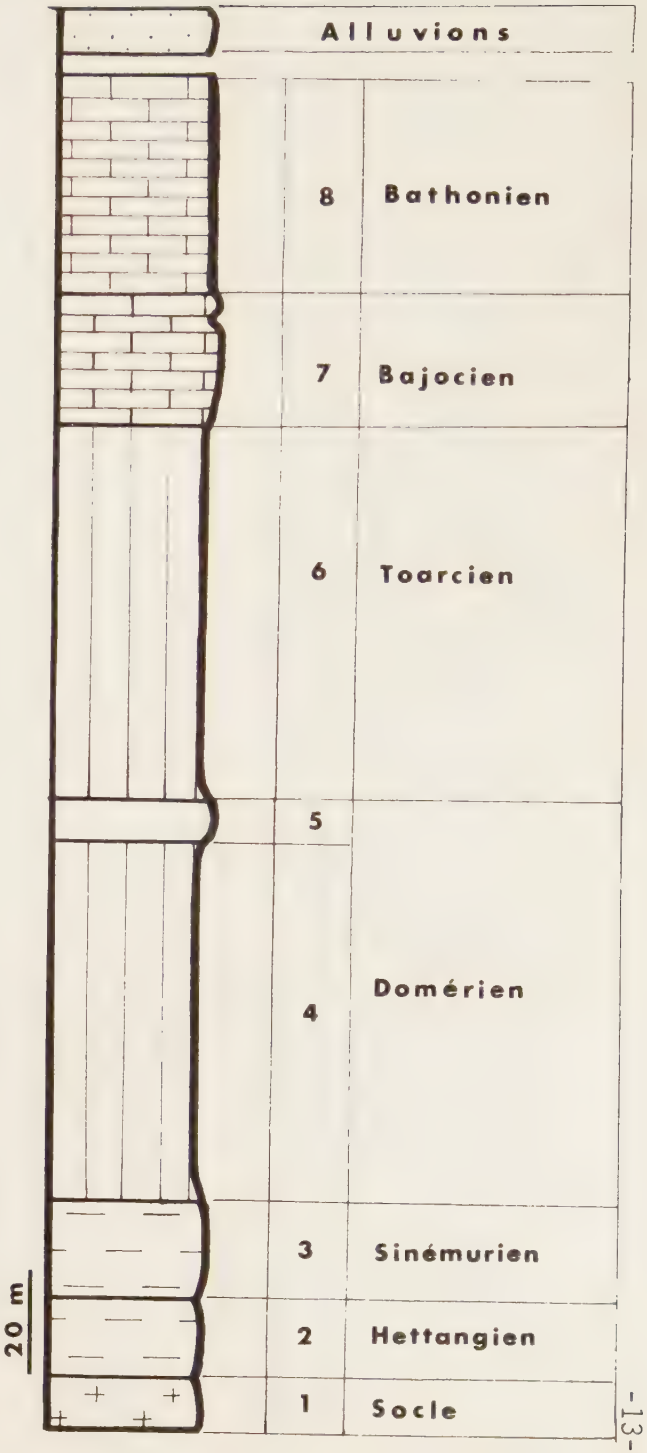
II LE MILIEU

Aux confins des plateaux de l'Yonne, dans la partie de l'Auxois bordée par les vallées du Serein et de l'Armançon, l'aire de fabrication du fromage d'Epoisses est limitée à une vingtaine de communes circumvoisines.

La carte p.13 montre les limites d'affleurement des terrains figurant dans la colone stratigraphique correspondante, et ils ont été réunis en 4 groupes en fonction de la lithologie. Ont été ainsi distingués :

- le socle (1) représenté par un granit à deux micas, affleure à la faveur des vallées au Sud de la région étudiée (MONTBERTHAULT - VIC DE CHASSENAY) ;
- l'Hettangien (2) et le Sinémurien (3), à dominante calcaire, forment un vaste plateau, fertilisé par les limons quaternaires. C'est une zône d'élevage (Pie Rouge de l'Est)
- le Domérien (4) et le Toarcien (6), argileux

N
Mont St Jean
Corsaint
Jeux lès Bard
Epoisses
Pouligny
Vic
Montberthault
1 Km


Alluvions
8 Bathonien
7 Bajocien
6 Toarcien
5
4 Domérien
3 Sinémurien
2 Hettangien
1 Socle
20 m

donnent des pentes couvertes par les pâturages du Nord de la région d'Epoisses (JEUX LES BARD). Le Domérien supérieur (5), constitue un replat au milieu de ce talus ;

- au Nord de la région considérée, les calcaires du Bajocien (7) et du Bathonien (8) couronnent les pentes du Lias en donnant des plateaux consacrés aux cultures et aux forêts.

L'aire de ramassage de lait était limitée à 8 km au nord d'EPOISSES (CORSAINT), 5 km au sud et 5 km à l'est. Le lait de la région de CORSAINT semble "donner" le meilleur Epoisses.

III LE DEVELOPPEMENT

C'est au XVIème siècle que le fromage d'Epoisses franchit officiellement les limites du duché mais il faut attendre le XVIIIème siècle pour que COURTEPEE, dans sa "Description du Duché de Bourgogne" éditée en 1775, indique que le "laitage et les fromages annoncent l'excellence des pâturages et la qualité des fromages qui l'emportent sur ceux de Brie". Dans le même temps, Jean-Antelme BRILLAT-SAVARIN gastronome qui s'illustra dans son immortelle "Physiologie du Goût", le consacre "roi des fromages" lors d'une étape qu'il fit à la ferme de la République, non loin de SOMBERNON.

Dès l'année 1812, à la suite d'une enquête sur les ressources laitières du pays, le Sous-Préfet de SEMUR précise : "... On ne fait pas de beurre. Tout le produit du lait sert à la fabrication des fromages gras. Ils ont beaucoup de réputation et sont appelés "fromage d'Epoisses", ils sont mis dans le commerce secs ou frais".

Dans un mémoire intitulé "l'Agriculture en Côte d'Or en 1840, R. LAURENT écrit : "Il n'y avait que dans l'arrondissement de SEMUR et plus particulièrement dans la vallée d'Epoisses que l'utilisation du lait avait pris un certain essor. Tout le produit était employé à la fabrication de fromages gras qui étaient "exportés". Renommés dès le début

du XIXème siècle, il s'en faisait un commerce considérable. On présume que 500 pièces sont exportées chaque semaine à Autun, Avallon, Dijon, Paris, Semur et ailleurs. Le fromage d'Epoisses était fabriqué en 1813 dans les communes suivantes : Epoisses, Bard, Corrombles, Forléans, Jeux, Torcy et Toutry". (Archives départementales, M/13 - XIV C/4).

Durant la seconde moitié du XIXème siècle, le comice agricole, très actif, organisa des concours locaux où les fromages tenaient une place prépondérante, les fermières rivalisant d'adresse et de subtilité pour obtenir un produit ayant un caractère et un cachet particuliers. C'est cet esprit d'émulation, de patience et de ténacité dont elles firent preuve pendant de nombreuses générations, qui porta le fromage d'Epoisses au point de perfection qu'il a atteint aujourd'hui.

L'empirisme traditionnel n'étant plus mis au service du "mystère" de la transformation du lait, la technique seule prévalant aujourd'hui dans l'études phénomènes régissant l'évolution de la masse caséeuse, c'est le seul élément susceptible de permettre une fabrication régulière satisfaisant aux exigences des consommateurs avertis.

IV CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

Le fromage d'Epoisses est à base de lait entier, cru, à caillé grossièrement divisé, à pâte molle non pressée, à croûte lavée. Ses dimensions : 10 à 12 cm de diamètre, 4 à 5 cm d'épaisseur ; son poids moyen égoutté est d'environ 300 grammes. Le pourcentage moyen de matières grasses à l'extrait sec est de 50 %.

B - FABRICATION

Le temps n'est plus où Emile DUCLAUX (89) pouvait en tête de ses "Principes de laiterie" faire cette pittoresque rélexion : "N'est-il pas singulier, écrivait-til, que dans une industrie où les microbes règent en maîtres, il y ait des traités de laiterie, et non des moins copieux, qui n'en parlent pas et qui décrivent la fabrication d'un fromage

comme si c'était celle d'un lingot d'acier ou d'une plaque de blindage".

Cela dit, de quoi s'agit-il ?

I GENERALITES

Le but de l'industrie fromagère est de transformer le lait en un produit plus concentré, donc d'utilisation prolongée et de goût différent, grâce à diverses actions microbiennes et enzymatiques.

La coagulation du lait et l'égouttage du caillé obtenu représentent, en effet, une sorte de dessication, qui constitue un moyen de conservation auquel il faut ajouter l'acidification provoquée par la fermentation lactique, qui s'oppose à l'envahissement par les bactéries de la putréfaction.

Ce double principe, de dessication et d'acidification lactique, va se retrouver, plus ou moins prononcé, dans la préparation de tous les fromages. C'est la raison pour laquelle bien que les actions microbiennes y soient puissantes, les laits fermentés du type yaourt et analogues, qui n'ont pas subi d'élimination du lactosérum ne sont pas de véritables fromages. D'ailleurs le décret du 26 octobre 1953, portant réglementation d'administration publique pour l'application du la loi du 1er août 1905 sur les fraudes, réserve l'appellation de fromage aux produits, fermentés ou non, obtenus par coagulation du lait, de la crème, du lait écrèmé ou de leur mélange, suivie d'égouttage et contenant au minimum 23 g d'extrait sec pour 100 g.

Les variétés de fromages sont très nombreuses (400 à 600 pour la France, selon les auteurs) et traduisent l'adaptation des techniques fermières aux conditions locales des divers "pays", dont la juxtaposition en mosaïque constitue la France. Les formats et les caractères ne sont pas dûs à des circonstances de pur hasard, mais sont l'aboutissement d'une expérience et de tentatives, parfois millénaires. Quelques grandes espèces (Saint-Paulin, Emmental, Camembert, etc...) ont largement débordé leur aire d'origine et sont frabriqués dans de nombreuses régions, voire à

l'étranger.

Avec le passage du stade artisanal au stade industriel, certains types ont de plus en plus tendance à dominer au détriment des petites variétés, dont l'importance commerciale s'estompe et qui restent localisés à une aire étroite de production et de consommation.

Le fromage d'Epoisses fait partie, encore à l'heure actuelle, de ces produits, généralement de vieille réputation, dont la production, du fait de la concurrence commerciale est limitée à une zône géographique étroite (une centaine de kilomètres autour d'Epoisses).

II TECHNIQUES FROMAGERES

Aujourd'hui, comme il y a mille ans, que ce soit dans le désert de Mauritanie ou dans les super-complexes industriels américains, la "fabrication" d'un fromage comporte les étapes fondamentales suivantes :

- le caillage du lait,
- la synérèse du caillé et son égouttage,
- la mise en forme, qui est, d'ailleurs à la source éthymologique même du mot fromage,
- le salage,
- l'affinage ou maturation, qui aboutira à un produit sapide recherché du consommateur et fort apprécié, au lieu du coagulum sans intérêt gustatif, de paracaséinate de chaux qui a plus ou moins entraîné avec lui de la matière grasse.

Il n'est nullement question de rappeler les principales techniques ; en effet, à chaque détail, c'est toujours la notion de variété qui apparaît, lorsque l'on cherche à envisager les méthodes, très anciennes pour certains, plus récentes pour d'autres, qui président à la fabrication de ces aliments.

1 - Le lait

Les fabricants de fromage d'Epoisses achetaient, avant 1965, le lait directement aux producteurs de la région, mais ceci présentait un gros écueil : il y avait un maximum de lait en été et mévente du fromage à cette époque, et un minimum en hiver où, par contre, la vente est multipliée par 3 ou 4.

Depuis 1965, le lait est acheté à la société BEL (Les Laumes), ainsi les quantités sont rationalisées. Néanmoins, ce lait est hétérogène, non standardisé, de propreté parfois douteuse car les contrôles sont sommaires, (test à la réductase seulement), d'où les accidents de fabrication (fermentation gazeuse au sein du caillé par exemple).

2 - Coagulation et égouttage du caillé

On sépare, par cette opération, la caséine, plus rarement les autres protides du lait, sous une forme floculée qui entraîne les matières grasses tandis qu'une partie de l'eau est éliminée, et avec elle, une fraction importante de substances solubles, tels le lactose et les sels minéraux.

On utilise, pour coaguler le lait, les enzymes provenant des estomacs de jeunes veaux.

Le ferment employé, le lab, présure ou chymosine, a fait l'objet de nombreuses études. On l'a obtenu à l'état cristallisé ; on sait qu'il s'agit d'un protide acide, du type des globulines, les conditions optimales d'action sont un pH = 5,4, une température de 40-41° C et la présence d'ions calcium. On connaît un certain nombre des actions que le lab exerce sur la caséine du lait. Cette dernière paraît exister sous forme d'un complexe qui a absorbé des ions calcium et qui apparaît, au microscope électronique, sous forme de particules de 40 à 200 mμ. Sous l'action du lab, ces particules s'accolent et forment des sortes de filaments. L'ensemble a l'aspect d'une gelée blanche et transparente. Depuis HAMMARSTEN, puis PORCHER, on sait aussi qu'environ 5 % de l'azote de la caséine ne sont pas modifiés. HAMMARSTEN considérait cette fraction ainsi séparée du reste du protide,

comme une "protéose". Quant à la fraction principale, elle serait transformée en paracaséinate de chaux. La fraction alpha de la caséine se sépare en 2 constituants paracaséine alpha et paracaséine beta, dont le sel de calcium est insoluble dans le lactosérum, alors que le sel correspondant de la caséine alpha est soluble.

Quant au sel de calcium de la caséine beta, il reste soluble aux environs de 0° C et protège alors la caséine alpha contre l'action de la présure. Vers 20-25° C, le sel calcique de la caséine beta est de moins en moins soluble et il ne protège plus la forme alpha. Divers travaux en cours tendent à préciser, de plus en plus nettement, l'action intime de la présure sur la caséine et, notamment, la structure exacte de la fraction arrachée par l'enzyme.

Dans la pratique fromagère, la présure utilisée est, en fait, un mélange de chymosine et, en plus faible quantité, de pepsine et de cathepsine ; celle-ci d'origine uniquement endocellulaire, se trouve en très faible proportion.

La fabrication de l'Epoisses met en oeuvre un lait de pH = 6,4 ; le caillage est dû à la présure employée à 3‰ et il faut avoir recours à l'action de la température pour séparer le lactosérum retenu dans le caillé. La température est de 25° à 28° C selon la saison et le temps d'emprésurage est de 12 heures environ.

Il en résulte que, dans ce produit où les activités de la présure et des microbes lactiques se superposent, la quantité de présure nécessaire est relativement faible, la température d'emprésurage peut être peu élevée, le découpage du caillé très réduit ; l'égouttage, d'abord lent, s'accélère avec le développement dans la masse du caillé, au cours du moulage, des streptocoques et lactobacilles.

Cette étape initiale de la fabrication (caillage du lait et égouttage du caillé) est d'une extrême importance. En effet, le développement des germes lui-même est conditionné par la texture et la composition physico-chimique du coagulum. Une fois celui-ci exécuté, il est extrêmement difficile d'apporter des corrections.

Le caillé se trouvant en bassine de 100 litres, est découpé par une lame en cubes de 2 à 3 cm^3 puis moulé à la pelle, égoutté pendant 4 heures environ et retourné 5 heures après.

Le démoulage a lieu le lendemain et les fromages sont déposés sur des claies métalliques. Ils sont alors prêts pour le salage.

3 - Le salage

Le salage produit plusieurs actions :

- il modifie le goût de façon favorable,
- il complète l'égouttage par une sorte de phénomène osmotique, en attirant à l'extérieur une partie de l'eau encore renfermée dans la caséine,
- surtout, lorsqu'il peut agir assez longuement, il provoque le début d'apparition de la croûte, par insolubilisation de la caséine et il renforce la solidité du fromage,
- il agit sur certaines enzymes et exerce une action sélective sur divers espèces microbiennes.

Auparavant, le salage du fromage s'effectuait par saupoudrage à sec. Ceci présentait de gros inconvénients ; le salage n'était pas uniforme et, si le sel devenait trop humide, il était exagéré. Aussi, lui préfère-t-on actuellement, le salage en saumure.

Celui-ci dure 45 minutes et 400 fromages sont plongés à la fois.

On doit, alors, surveiller l'évolution de la microflore, notamment la multiplication des levures et de *Geotrichum*, qui risquent de s'installer au niveau des petites excoriations de la croûte et provoquer le début d'un chancre.

A la sortie du saumurage, les fromages sont "séchés" dans un courant d'air ou dans une petite pièce chauffée à 35° C.

4 - Maturation et affinage

Ils se poursuivent dans les haloirs maintenus à une température de 10° C, les fromages étant disposés sur des clayons d'acier inoxydable.

Les fromages sont lavés tous les 2 à 3 jours. Le premier lavage se fait à l'eau salée pour accélérer la formation de la croûte, puis, dès le début du croûtage, par 1/3 de Marc de Bourgogne et 2/3 d'eau. On facilite, en outre, en entretenant humide et légèrement salée la croûte superficielle, le développement d'une couche externe de germes microbiens, la "morge" qui renferme des espèces protéolytiques libérant de l'ammoniac.

Au bout d'une quinzaine de jours à 3 semaines, les fromages sont mis sur des claies en bois, ce qui provoque un ensemencement naturel et accélère le développement "des ferments du rouge".

Dès que le "morge" prend une teinte jaune-orangé, on effectue un troisième lavage avec du Marc de Bourgogne pur. Le fromage d 'Epoisses est, à notre connaissance, le seul qui subit un lavage à l'alcool. Ce point mériterait une étude approfondie afin de connaître le devenir de cet alcool, et son action sur la microflore implantée.

Les fromages sont retournés tous les 2 jours, ceci afin de conserver l'aérobiose nécessaire aux germes se développant en surface.

Pour la présentation en vue de la commercialisation (6 semaines environ après le caillage), les fromages étaient présentées sous feuilles de papier cellophane, cela présentait de gros inconvénients pour la conservation, l'aérobiose étant en partie détruite. Pour y remédier, depuis 1973, ils sont commercialisés dans des boîtes rondes en bois de pin.

C H A P I T R E IV

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE D'EPOISSES : SON EVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION

I INTRODUCTION

Les microorganismes jouent un rôle essentiel au cours de la maturation des fromages et ce rôle a notamment été établi à la suite des travaux de DUCLAUX, de FREUDENREICH, de ORLA-JENSEN et de MAZE. Toutefois, l'importance numérique de divers groupes microbiens présents et, surtout, l'action respective de ces groupes ne sont encore qu'imparfaitement connues.

Ainsi, pour de nombreux types de pâtes fromagères, il est difficile de préciser si la maturation, et plus particulièrement la dégradation des matières azotées, est principalement due à l'activité des germes apportés par un levain ou si, au contraire, la flore spontanée joue un rôle majeur dans cette dégradation. Dans le cas du fromage d'Epoisses seule cette dernière éventualité était, évidemment, à envisager.

Jusqu'ici de tels problèmes ont surtout été étudiés sur des fromages étrangers, fromages suisses (40) italiens (47) et, plus particulièrement sur le Cheddar (2,7,62,70,76,82), le Limburg (54,55) , le Vacherin Mont d'Or (71, 89, 91), le Télémé (64, 65).

Les travaux relatifs aux fromages fabriqués en France sont encore assez peu nombreux : Camembert (50, 58, 59) Saint-Paulin (36, 37, 38), Roquefort (26 à 35, 45) , Saint-Nectaire (15, 16, 20).

Nous avons cherché à préciser, sur un fromage de type Epoisses (pâte molle), la nature de la flore microbienne,

notamment son évolution au cours de la maturation, et , ses espèces dominantes, en insistant plus particulièrement sur l'importance relative de quelques groupes microbiens au sein des microflores superficielle et interne.

II PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Notre étude a porté sur une série de fromages provenant de la même fabrication et les échantillons ont été prélevés aux différents stades de l'affinage (en général, toutes les semaines).

Les fromages ont été maintenus à basse température (4°C) lorsque les analyses n'ont pû être effectuées le jour même.

1 - Analyse microbiologique du fromage

-a) préparation de l'échantillon

Elle a comporté les opérations suivantes :

- nous prélevons chaque fois sur un fromage entier, 4 échantillons :
  - . 2 en surface par grattage de chacune des faces,
  - . 2 au centre du fromage.

Nous n'avons pas enlevé la "croûte" car celle-ci est peu importante et mangeable.

- les portions prélevées sont homogénéisées dans un mortier stérile et 1 gramme de pâte pesé au dg près est dissous dans 9 ml d'une solution stérile de citrate trisodique à 2%. On obtient alors une suspension de fromage diluée au 1/10e, prête pour l'analyse.

- nous avons alors appliqué la technique de dilution dans une solution de Ringer au 1/4. Deux boîtes de Pétri sont utilisées par échantillon, correspondant chacune à une dilution déterminée. On compte les colonies (entre 30 et 300) et on exprime le résultat par un nombre de germes par gramme de fromage, en tenant compte de la dilution réalisée.

-b) dénombrement de la flore totale

La microflore totale a été dénombrée sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479).

-c) dénombrement des Streptocoques

Celui-ci a été réalisé sur gélose additionnée à 0,5‰ d'acétate de thallium (48).

-d) dénombrement des Lactobacilles

Nous avons utilisé le milieu MRS : DE MAN, ROGOSA et SHARPE (21) modifié par MABBITT et ZIELINSKA (62).

On compte les colonies qui apparaissent sous la forme de clônes blanchâtres, à contours réguliers ou irréguliers. Une coloration au bleu de méthylène est nécessaire.

-e) recherche et dénombrement des bactéries coliformes

Différents milieux de culture ont été retenus :

. pour la recherche des coliformes, le milieu liquide aux sels biliaires et au vert brillant. La fermentation du lactose produit un dégagement gazeux. Les tubes ont été mis à incuber à 37° pendant 24 heures et à 44,5°C (test de Mackenzie) pendant 24 heures. Le dégagement de gaz indique la présence de coliformes dans le 1er cas et d'E. coli dans le 2ème cas.

. pour le dénombrement le milieu "Violet Red Bile Agar" Oxoïd est utilisé. La fermentation du lactose entraîne le virage de l'indicateur (rouge neutre) au rouge.

-f) dénombrement des levures

Il est fait sur milieu gélosé à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13) ajusté à pH 3,5 avec de l'acide tartrique stérile à 10%.

L'incubation se fait à 25°C pendant 5 jours. On compte les levures qui se présentent sous forme de colonies rondes, plus ou moins bombées ou plates en surface, lenticulaires en profondeur.

-g) dénombrement des Microcoques et autres bactéries halophiles

Nous avons utilisé le milieu de CHAPMAN (13) (Mannitol Salt Agar Difco n° 30).

En outre, certains caractères susceptibles d'influer sur le développement et l'activité des microorganismes ont été déterminés.

2 - Analyse chimique du fromage

Analyses courantes

-a) Mesure du pH

Le pH est mesuré au 1/100 par potentiométrie en réalisant une suspension à 10% de fromage dans de l'eau bidistillée.

-b) teneur en matière sèche

L'extrait sec est déterminé par la méthode officielle de la F.I.L. (norme n°4) (57) C'est la masse exprimée en % pondéral subsistant après le processus de dessication (broyage d'un poids connu de fromage, avec du sable de quartz et dessication à 105°C jusqu'à poids constant).

-c) évolution du poids du fromage

Il nous a paru intéressant de suivre la perte globale en eau des fromages au cours de la maturation. Malheureusement, nous n'avons pu effectuer les pesées en même temps que les analyses.

Elles ont été faites du 16 juin au 18 août 1973, sur deux lots de 10 fromages.

Le premier lot datait du 15 juin 1973 : il s'agissait de fromages salés, pris au hasard sur des claies différentes, mais de même fabrication. Leur lavage a été régulier (2 fois par semaine) et ils ont été rangés au même endroit et à la même hauteur.

Le deuxième lot datait du 5 juillet 1973 et les pesées ont été faites dans les mêmes conditions.

Remarques : 1ère quinzaine de juillet : temps très sec
2ème quinzaine de juillet : temps pluvieux
mois d'août : temps très sec.

-d) dosage du NaCl

Nous avons employé la méthode de CHARPENTIER-

VOHLARD normalisée par la F.I.L. (norme n° 17) (57).

. Principe

Par teneur en sel du fromage, on entend le poids de NaCl exprimé en % contenu dans le fromage.

Le NaCl est libéré par destruction de la matière organique du fromage par le permanganate de potassium et de l'acide nitrique. Les ions chlorure sont dosés par titrage au nitrate d'argent et au thiocyanate d'ammonium.

. Dosage

On pèse au mg près, dans un erlenmeyer, environ 2 g de fromage. On ajoute exactement 25 ml de solution de nitrate d'argent 0,1 N, on agite et on ajoute 25 ml d'acide nitrique concentré. On chauffe jusqu'à ébullition et on ajoute 10 ml de solution de $KMnO_4$ et on maintient à douce ébullition. Quand le mélange se décolore, on ajoute du $KMnO_4$ (5 à 10 ml suffisent en général).

On ajoute 100 ml d'eau et 5 ml de la solution de sulfate ferrique ammoniacal et on mélange soigneusement. On titre immédiatement l'excès de nitrate d'argent au moyen dy thiocyanate 0,1 N jusqu'à ce que la solution présente une couleur brun-rouge persistant au moins 30 secondes.

Le taux de NaCl est calculé et exprimé en % du poids total de fromage.

III RESULTATS

1 - Les résultats concernant les caractéristiques chimiques des échantillons sont groupés dans le tableau I :

urée de aturation		Caillé non salé 3 jours	Caillé salé 10 jours	Fromage de 16 jours	Fromage de 25 à 27 jours	Fromage de 35 jours	Fromage de 46 à 48 jours
ctière sèche en g %		31,5	35,8	34,7	35,75	37,4	40,9
NaCl en g/%	I	0,12	1,87	1,30	1,54	2,02	2,03
	E	0,12	2,16	1,21	1,47	1,54	1,66
pH	I	4,92	4,85	4,87	4,92	5,45	5,45
	E	4,92	5,06	5,25	5,72	7,05	7,45

TABLEAU I

Caractéristiques chimiques des échantillons :

I = intérieur du fromage
E = partie superficielle du fromage

-a) la teneur en matière sèche, comprise entre 31,5% et 40,9% augmente en cours d'affinage, ce qui est tout à fait normal.

Ceci est à mettre en corrélation avec les pertes en poids des fromages, en fonction du temps (fig.1)

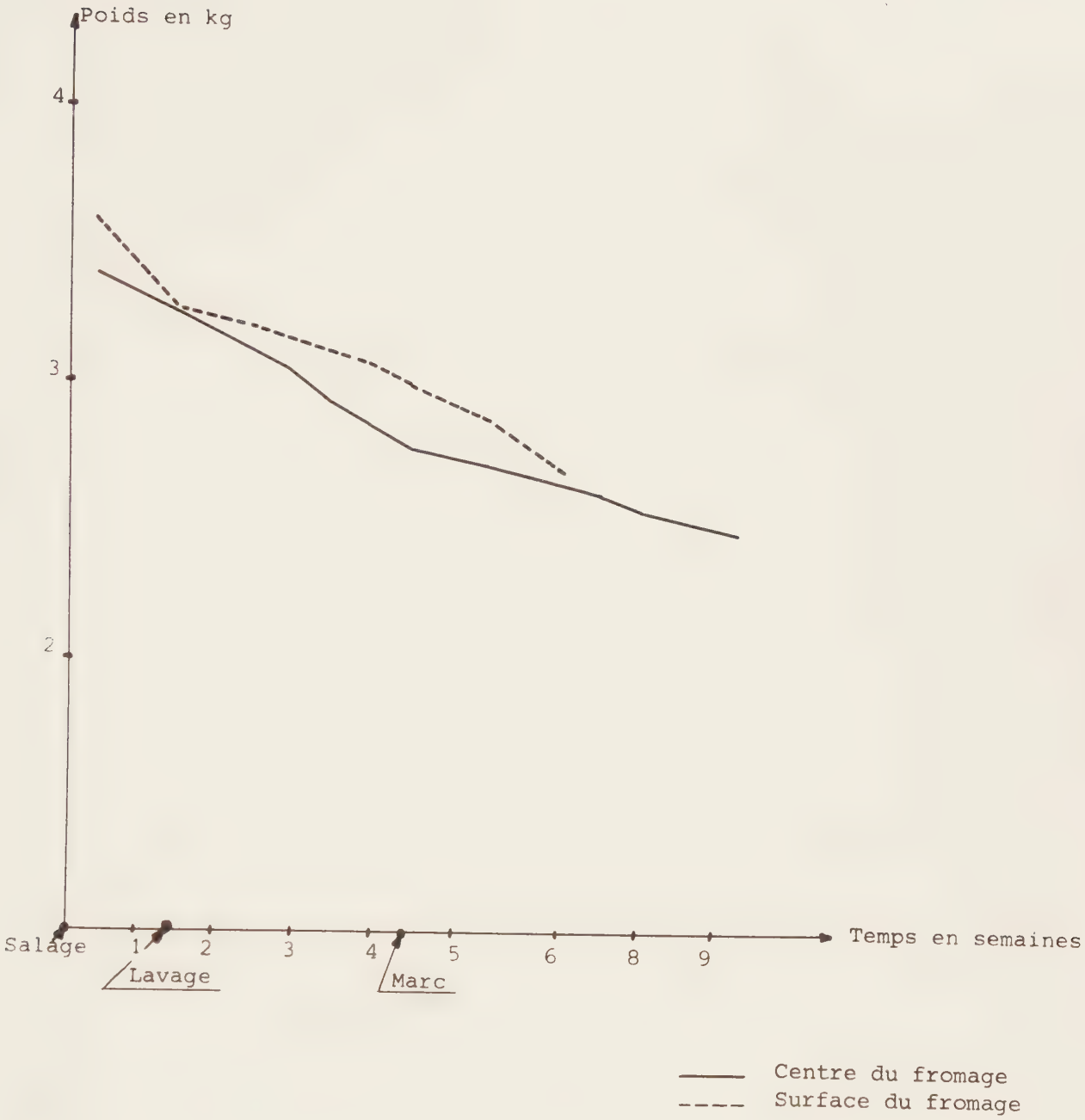
Dates	16.6.73	3.7.73	7.7.73	14.7.73	21.7.73	31.7.73	4.8.73	11.8.73
Poids en kg (10 fromages)	3,400	3,050	2,930	2,770	2,700	2,600	2,550	2,475

Série 1

Dates	7.7.73	14.7.73	21.7.73	31.7.73	4.8.73	11.8.73	18.8.
Poids en kg 10 Fromages	3,600	3,280	3,200	3,080	3,000	2,860	2,690

Série 2

fig 1 : PERTES DE POIDS EN FONCTION DU TEMPS

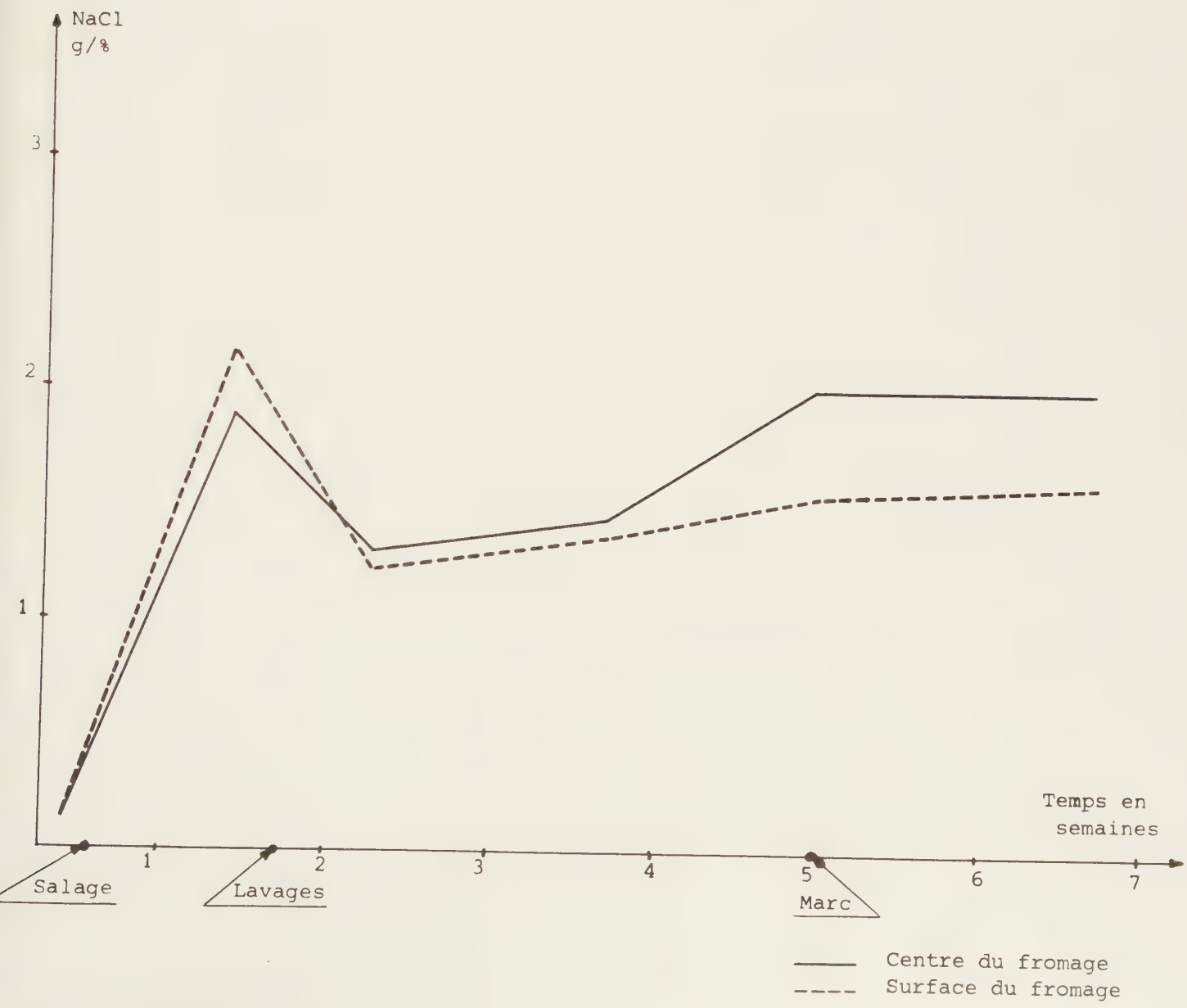


La perte en poids est plus marquée dans les 15 premiers jours (35 à 40 g/ fromage). Cette période correspond à l'égouttage, au saumurage, au ressuyage avant entrée au haloir. En moyenne, sur un mois d'affinage, les fromages perdent environ 60 g de leur poids.

-b) la teneur en NaCl,

qui devrait être voisine de 2%, varie d'un échantillon à l'autre. Comme il est normal, on note sur les fromages jeunes une différence entre les teneurs en sel de la partie superficielle et celle du coeur du fromage. Cette différence sensible s'atténue ensuite.

fig 2 : EVOLUTION DU NaCl

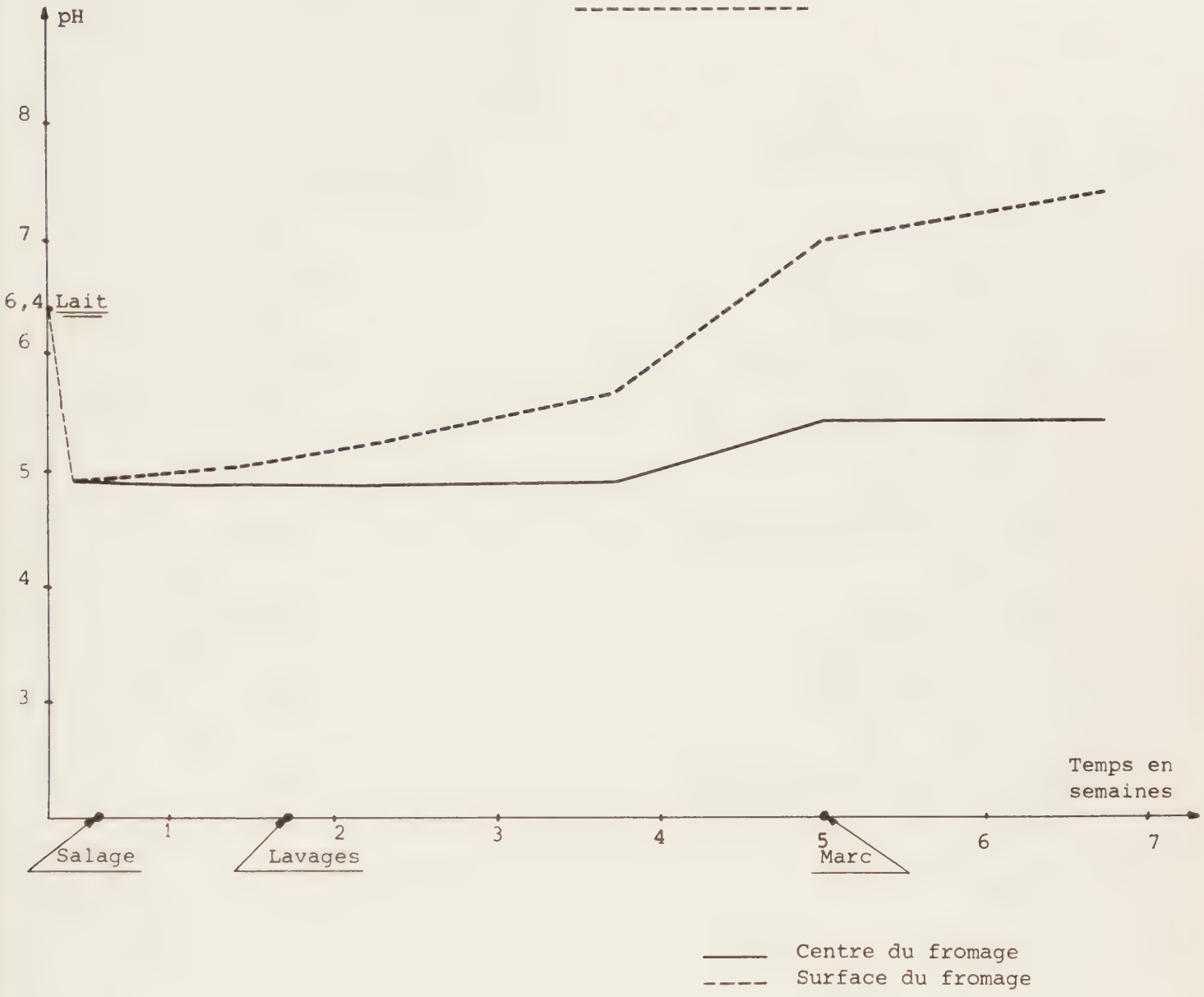


On remarque toutefois, une baisse très nette de teneur en NaCl : cette diminution correspond à la période des lavages successifs. L'eau salée, utilisée à cet effet, n'ayant pas la même concentration en NaCl que la saumure, expliquerait le fait que la couche externe lavée soit moins salée que le centre même du fromage. Il existerait donc un certain effet d'élimination, par lavage, du sel lors du traitement.

De ce fait, le coeur du fromage a une teneur normale en NaCl en fin d'affinage (voisin de 2%), tandis que la couche externe s'écarte de cette valeur.

-c) l'évolution du pH suit une courbe tout à fait normale (fig.3); Après une acidification dans les premiers jours de fabrication (lait pH = 6,4 ; caillé pH = 4,9)., on constate une nette remontée du pH en particulier à la surface du fromage dûe à l'action de germes protéolytiques.

fig 3 : EVOLUTION DU pH



La couche externe, entretenue humide et légèrement salée, facilite le développement de germes microbiens, la "morge" qui renferme des espèces protéolytiques attaquant fortement la caséine pour donner des substances telles que des peptones; des acides aminés et de l'ammoniac, dont une partie pénètre dans la pâte et vient corser le goût. De nombreuses substancesainsi libérées par voie biologique, transforment en un produit sapide, le caillé sans goût spécial qui avait été obtenu lors de la coagulation du lait. L'interprétation de cette courbe sera reprise plus loin et mise en relation avec l'évolution

des microflores aux différents stades d'affinage.

2 - Le tableau II groupe les résultats des dénombrements effectués et les chiffres qui ont servi à établir les graphiques correspondent à la moyenne des numérations (4 essais), ceci pour des fromages d'une même fabrication au même stade de maturation.

Durée de maturation	Caillé salé 3 jours	Caillé salé 10 jours		Fromage de 16 jours		Fromage de 25 jours		Fromage de 46 jours	
		I	E	I	E	I	E	I	E
MICROFLORE TOTALE MESOPHILE	56×10^7	6×10^7	12×10^7	22×10^6	30×10^8	22×10^6	32×10^8	2×10^7	29×10^8
STREPTOCOQUES	41×10^7	4×10^7	$1,5 \times 10^7$	2×10^7	9×10^6	$1,2 \times 10^7$	10^7	2×10^6	2×10^7
LACTOBACILLES	10^2	3×10^4	$3,7 \times 10^4$	2×10^3	$1,5_4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	5×10^3	8×10^2	2×10^3
LEVURES	66×10^4	25×10^5	16×10^7	6×10^6	15×10^8	23×10^5	70×10^8	7×10^5	39×10^7
MICROCOQUES ET BACTERIES HALOPHILES	3×10^3	7×10^3	12×10^4	36×10^2	65×10^3	25×10^3	16×10^5	66×10^3	13×10^8

TABLEAU II

La microflore de l'Epoisses aux différents stades de la maturation (nombre de germes par gramme de fromage).

I = Centre du fromage

E = Surface du fromage

Remarques : nous avons fait les mêmes analyses sur des fromages provenant de différentes fabrications à des stades définis de maturation. Les résultats ne sont pas toujours parfaitement concordants (variation dans la matière première, locaux, eaux, etc...) mais, il existe une certaine similitude quant aux

nombres et espèces de germes trouvés à un stade donné de l'affinage et, par la suite, dans l'évolution des diverses populations.

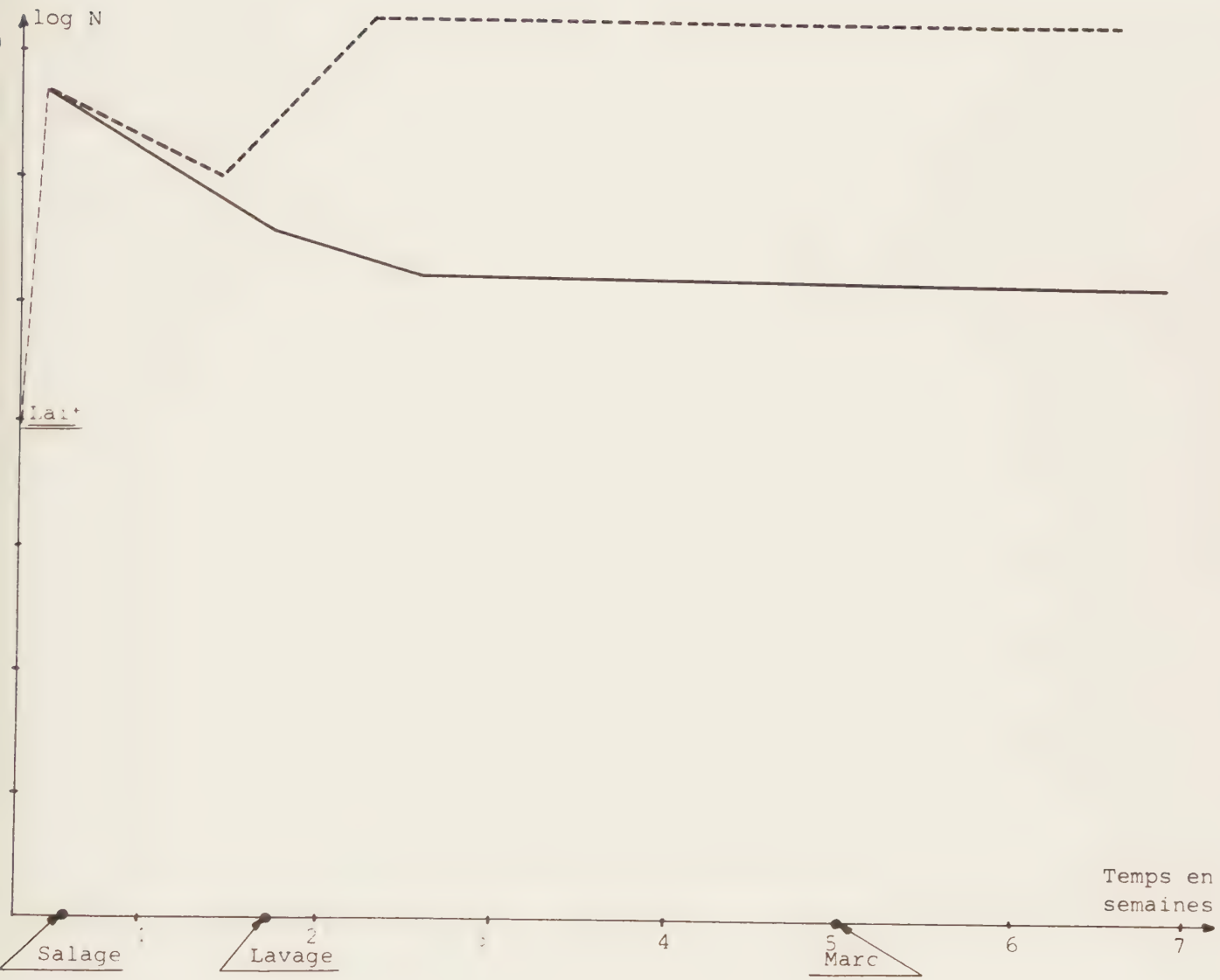
Néanmoins, la flore lactique de départ est totalement différente par le nombre et les espèces des micro-organismes. Ceci provient du fait que ces analyses ont été conduites après janvier 1973, époque à laquelle la Société BERTHAUD décidait l'utilisation courante du levain "Flora Danica". Ce dernier est composé entre autres des souches suivantes : *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus cremoris et Leuconostoc citrovorum* (germes acidifiants et producteurs d'arôme).

EVOLUTION DES DIFFERENTES MICROFLORES

Les figures 4, 5, 6, 7 et 8 représentent l'évolution des grands groupes bactériens dénombrés.

Les figures 9 et 10 nous montrent l'évolution de la flore globale superficielle ou interne, au cours de la maturation.

fig 4 : EVOLUTION DE LA MICROFLORE TOTALE



——— Centre du fromage
---- Surface du fromage

fig 5 : EVOLUTION DES STREPTOCOQUES

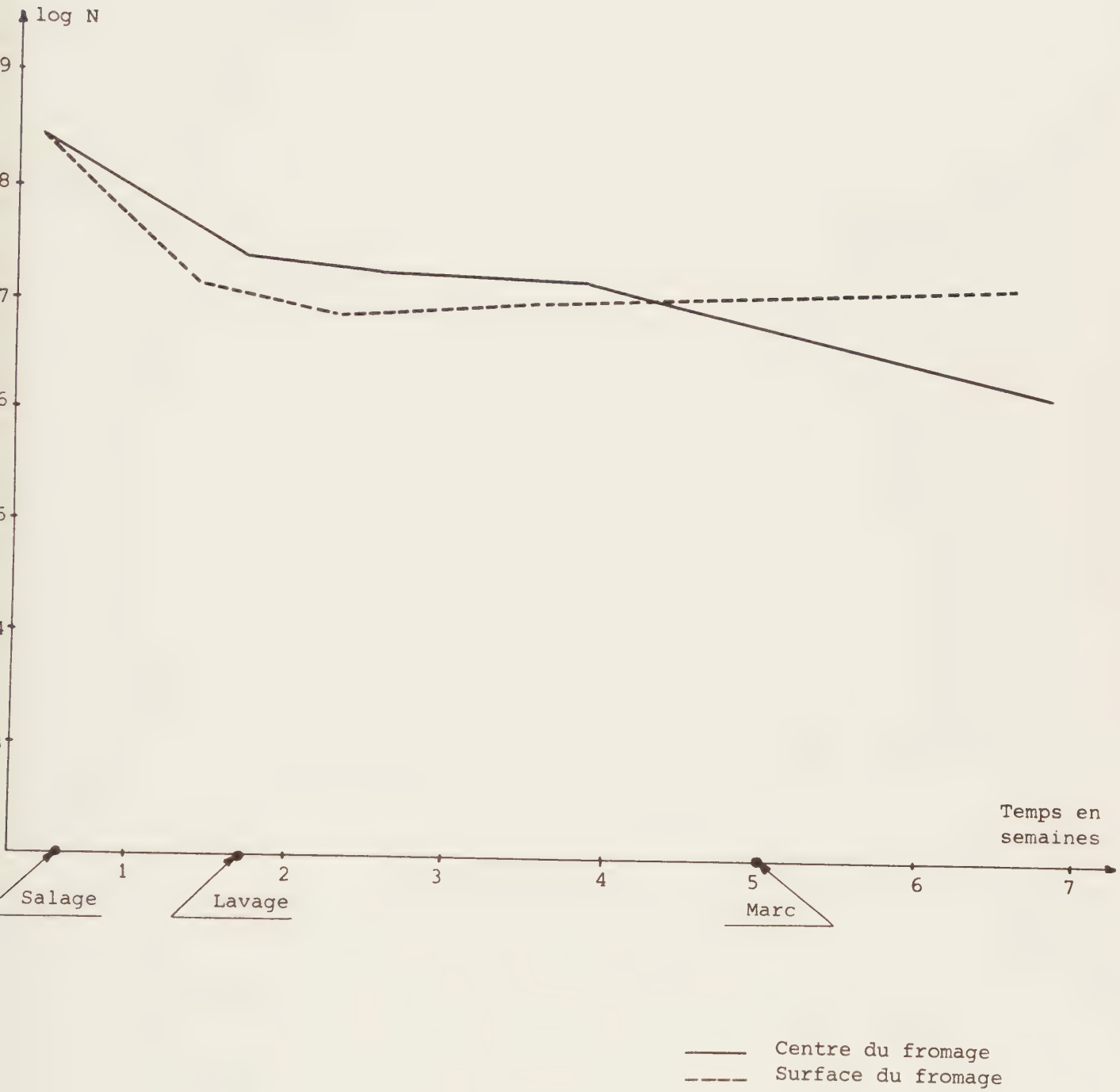


fig 6 : EVOLUTION DES LACTOBACILLES

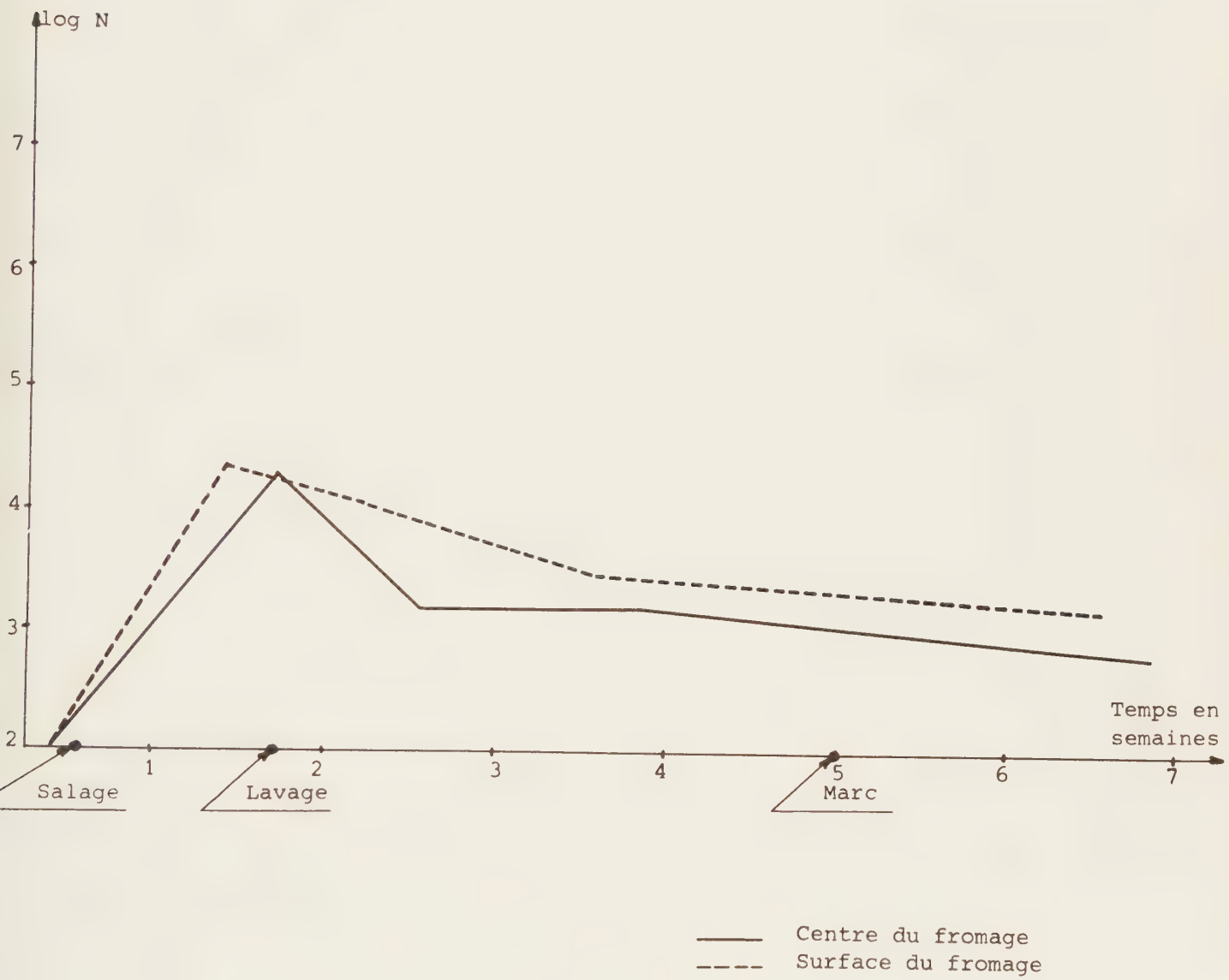


fig 7 : EVOLUTION DES LEVURES

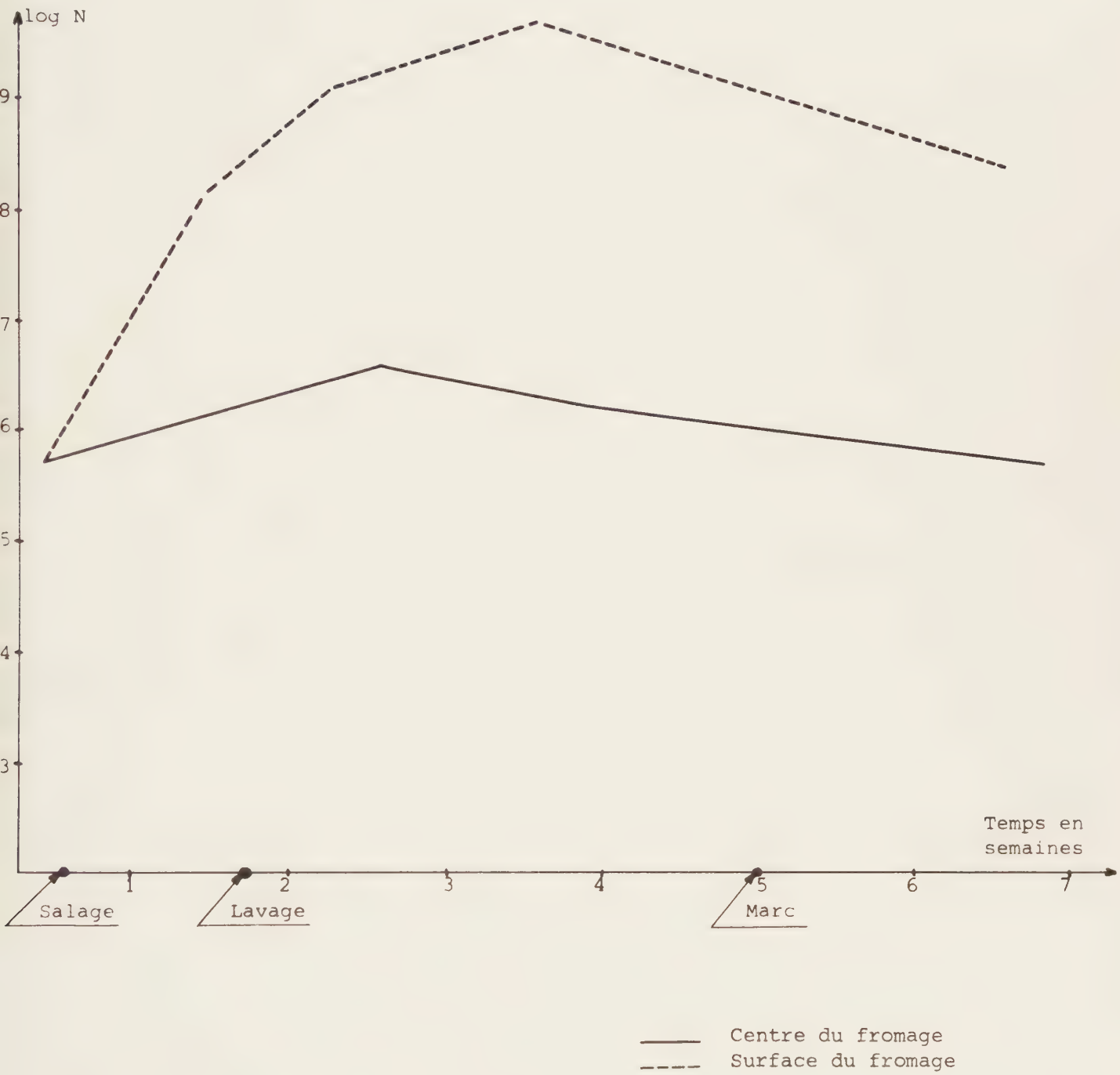


fig 8 : EVOLUTION DES MICROCOQUES ET BACTERIES HALOPHILES

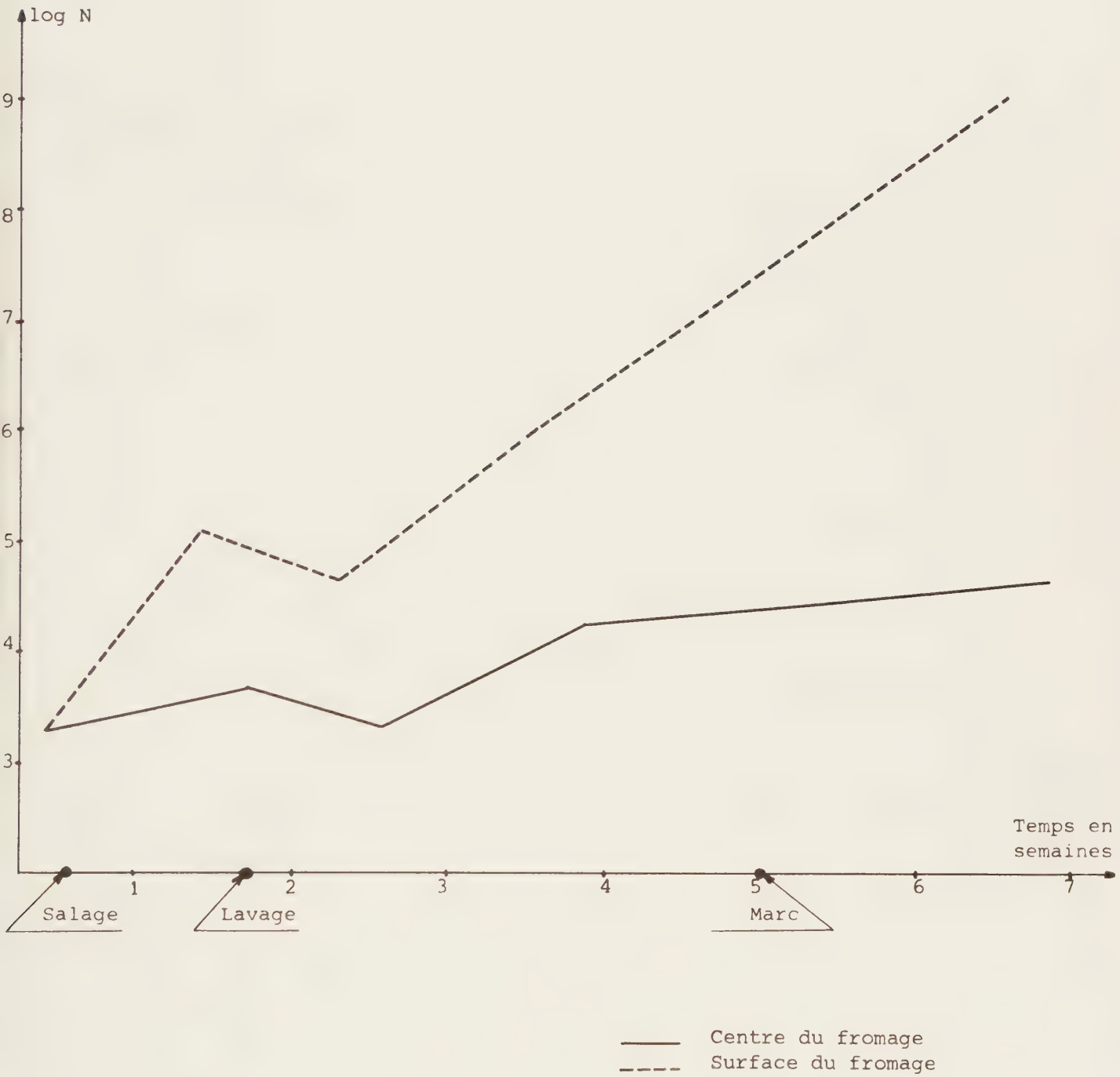


fig 9 : EVOLUTION DES MICROFLORES AU CENTRE DU FROMAGE

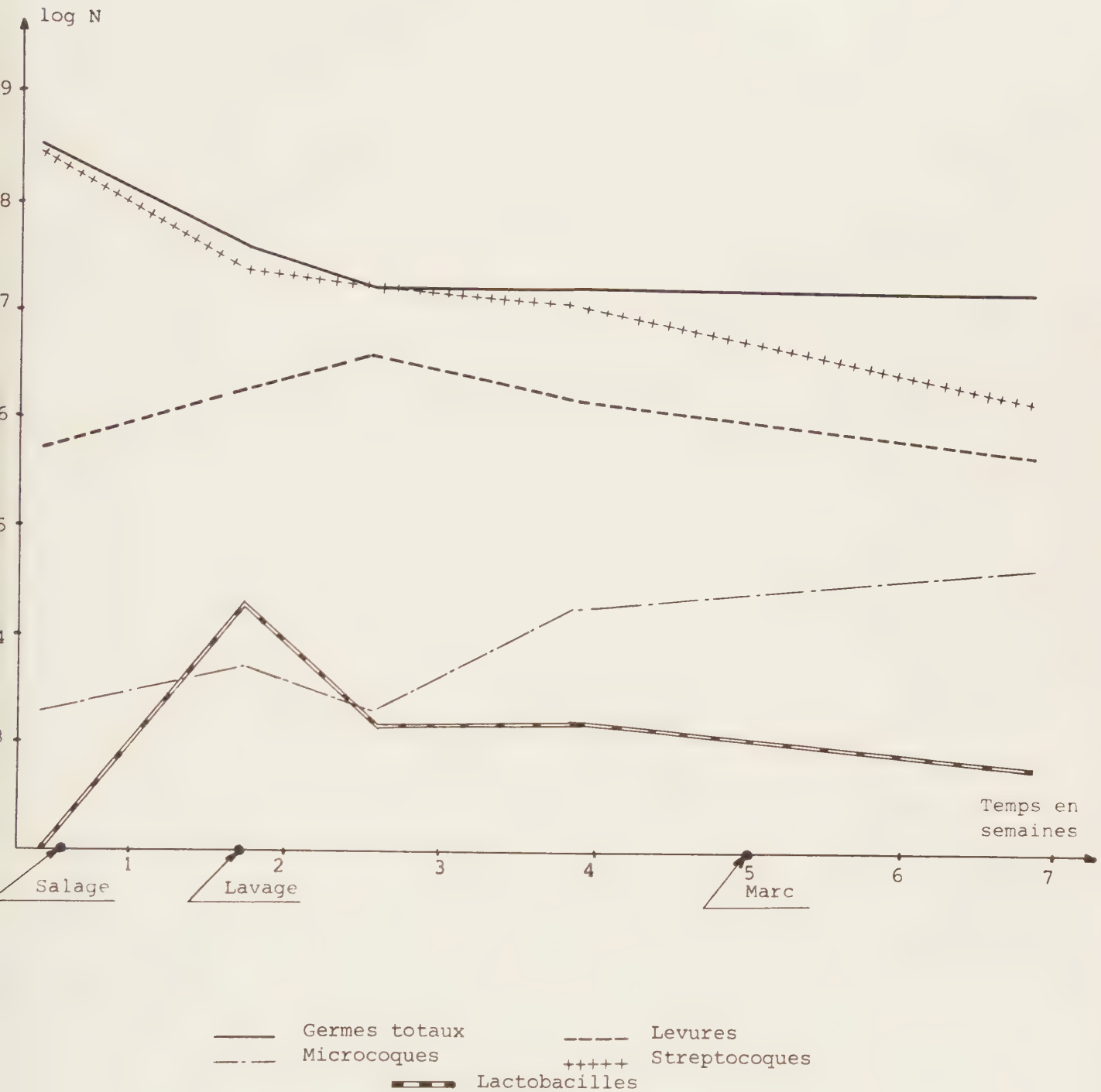
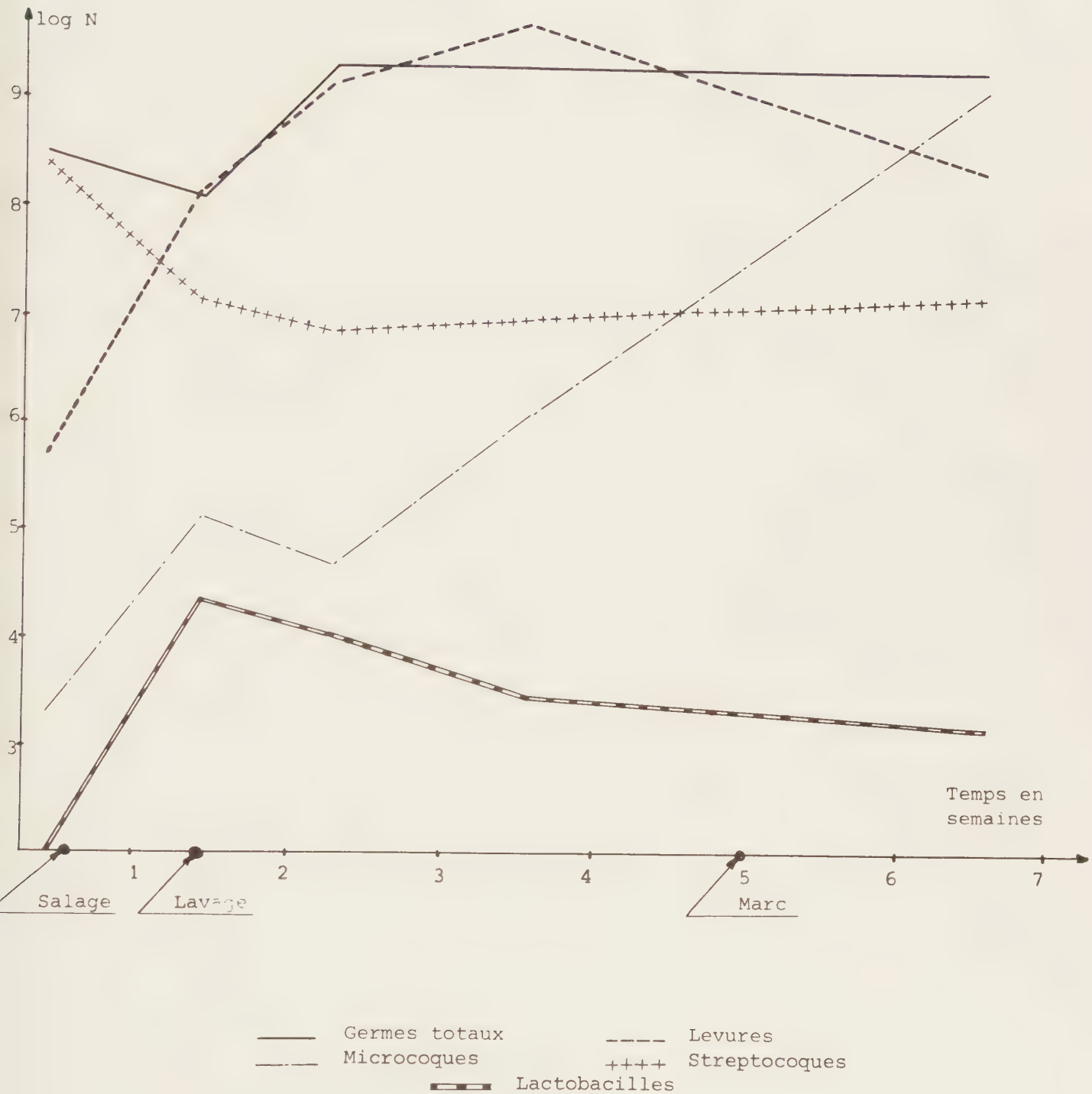


fig 10 : EVOLUTION DES MICROFLORES A LA SURFACE DU FROMAGE



IV DISCUSSION DES RESULTATS

1 - La microflore totale représente dans le caillé non salé, un nombre de germes voisin de $6x10^8$ par gramme. Cette population est proche de celle observée sur d'autres types de fromages (Camembert : $14x10^8$ (58) , Saint-Paulin $16x10^8$ (36)

Après quelques jours de maturation, on constate une diminution très sensible du nombre de germes vivants. Ceci est l'effet du salage qui entraîne une sélection des microorganismes.

Si l'on compare les microflores totales superficielle et interne (tableau II, fig.4), on remarque que le nombre des germes totaux internes se stabilise après 3 semaines de maturation, tandis que ce nombre augmente en surface très sensiblement après 10 jours d'affinage et, par la suite, reste stationnaire.

On doit admettre que dans les premiers stades de la maturation, une proportion assez importante de microorganismes présents initialement, meurent. Ces germes pourront alors, après lyse de la cellule bactérienne, intervenir dans le phénomène d'affinage par leurs enzymes intracellulaires libérées. L'ensemencement naturel vient également grossir cette population superficielle mais il doit être surveillé afin de ne pas entraîner d' accidents d'affinage.

Remarques : si l'on compare les résultats obtenus pour les flores totales avec l'ensemble des groupes bactériens dénombrés sur milieux électifs, il est évident que tous les microorganismes n'ont pû croître sur le milieu utilisé (Plate Count Agar). Malheureusement, on ne connait aucun milieu permettant la croissance de toutes les espèces bactériennes présentes dans un fromage (par exemple).

2 - Les Streptocoques (fig.5) représentent la majeure partie de la flore totale aussi bien interne que superficielle (fig 9 et 10). Cependant, leur importance relative diminue après le salage et les lavages jusqu'au stade de la commercialisation, en particulier au centre du fromage. Par contre, en surface, on note une légère augmentation

de ces microorganismes et ce, 4 jours environ après le début des lavages. Ceci pourrait s'expliquer par les lavages successifs avec une eau peut-être souillée, les Streptocoques fécaux étant ici en grand nombre et halophiles. Mais, ces germes ne sont pas à négliger car, par leur activité biochimique, notamment leur action sur les protéines et leur produits de dégradation, (29, 31, 34, 84), ces microorganismes peuvent contribuer utilement à la maturation des fromages et à la formation de l'arôme (diacétyle, acétoïne, acétaldehyde, amines etc...).

3 - Les lactobacilles (fig.6) sont relativement peu nombreux et, après une première phase de multiplication, leur nombre ne cesse de décroître.

Le salage semble avoir sur eux un effet très important et en particulier inhibe leur multiplication.

4 - Caractéristique aussi est l'évolution des levures (fig.7). Dans le caillé, ces microorganismes atteignent le nombre de $6x10^5$ par gramme.

A la surface, ils prolifèrent très activement jusqu'aux environs du 25ème jour et, à ce stade, leur nombre est de $7x10^9$; par la suite, ce nombre tend à décroître mais reste tout de même proche de $4x10^8$ et ils constituent avec les Microcoques, l'essentiel de la flore superficielle.

A l'intérieur, le nombre des levures est nettement moins élevé et cela dès les premiers jours. Il se produit cependant un développement sensible de ces microorganismes jusqu'au 18ème jour, puis il y a lyse des cellules.

Ces différences de population sont peut-être dues à la contamination par l'air ambiant de la surface du fromage et au manque d'oxygène au centre. Il faut noter, pour mémoire, que les levures appartenant à de nombreux genres, sont capables de produire des acides organiques à partir des sucres. Cependant il ne semble pas que leur action puisse modifier l'évolution du pH dans le fromage. Par contre, la majorité d'entre elles peuvent consommer, par voie oxydative, l'acide lactique : il en résulte alors, une augmentation du pH (cas du fromage).

5 - L'évolution des Microcoques et autres bactéries halophiles, est particulièrement caractéristique (fig.8).

En surface, leur nombre croît très rapidement et de $3x10^3$ dans le caillé non salé, il atteint $13x10^8$ en fin d'affinage. Ainsi, ces microorganismes qui ne représentent dans le caillé qu'une infime partie de la flore, forment la majeure partie de celle-ci dans le fromage affiné.

A l'intérieur, par contre, le nombre des microcoques augmente peu.

Ces germes jouent un rôle très important dans l'affinage et la formation de la "morge" ; en général ils sont pigmentés en jaune, orange ou rouge, sont caséolytiques et exercent des activités stimulantes vis-à-vis d'autres bactéries lactiques. (22, 23, 24, 27, 35, 38).

Les résultats doivent cependant être interprétés en tenant compte du fait que les dénombrements effectués sur le milieu de CHAPMAN n'intéressent pas uniquement les Microcoques. D'autres espèces halophiles, en particulier les Streptocoques du groupe D, les Bacillus, peuvent aussi cultiver sur ce milieu. Des isolements ont, effectivement, permis de caractériser sur les fromages en voie d'affinage, la présence d'une proportion importante d'entérocoques et de Bacillus.

6 - Quant aux bactéries coliformes, leur nombre est beaucoup trop variable d'un échantillon à l'autre pour permettre de caractériser le type du fromage.

7 - Remarques et conclusions :

Avant de discuter les corrélations entre les résultats microbiologiques et chimiques, il est nécessaire de clarifier quelques points.

Cette méthode d'étude de la microflore d'un fromage permet, seulement, de tirer des conclusions générales. Cela provient des erreurs d'échantillonnages et d'autres causes que nous allons examiner.

Tout d'abord, les échantillons prélevés aux divers stades de la maturation proviennent, non pas du même fromage mais de différents fromages faits avec la même cuve. Or, chaque

fromage est à lui seul une unité, une petite "usine biologique". Les erreurs les plus significatives proviennent des dilutions et des comptages des plaques gélosées malgré toutes les précautions prises.

Un bon exemple d'erreur due à l'échantillonnage nous est fourni par l'observation des résultats relatifs aux bactéries coliformes : ces germes proviennent quelquefois du lait (qui devrait en être exempt), mais surtout, des manipulations successives dont les fromages font l'objet. Les niveaux variables de contamination ne sont pas le reflet d'une variation dans le nombre de coliformes au cours de la maturation, mais d'une contamination variable selon les fromages.

Malgré toutes ces inexactitudes, les résultats chimiques et microbiologiques nous permettent de tirer certaines conclusions.

L'étape technologique la plus marquante est sans conteste le salage. Il entraîne une diminution de la microflore totale, des Streptocoques, des Lactobacilles. A l'inverse, il stimule le développement des Microcoques et l'ensemencement naturel qu'il provoque est indéniable pour ces germes (hypothèse vérifiée par l'examen microbiologique de la saumure utilisée). Il n'a, par contre, aucun effet sur les levures qui continuent à se multiplier.

A ce stade, les germes acidifiants, (Streptocoques, Lactobacilles) étant en partie inhibés, le pH reste à peu près constant (aux environs de 4,9 - 5,0). l'équilibre en NaCl entre la surface et le centre du fromage, se fait peu à peu.

La deuxième étape importante est la période des lavages. Jusque là, certains germes se sont trouvés inhibés, d'autres se sont implantés peu à peu, le pH évolue peu.

Le premier lavage à l'eau salée entraîne, à nouveau une sélection parmi ces microorganismes. Son action est peu sensible au sein du fromage mais nette en surface où le nombre des Microcoques et levures augmente. Par suite, on note une évolution de pH très marquée (en surface) jusqu'au dernier lavage au Marc de Bourgogne (5ème semaine).

Ceci est en relation étroite avec la multiplication

spectaculaire des Microcoques qui donnent des produits extracellulaires alcalins. De plus, les levures commencent à être lysées et libèrent dans le milieu leurs enzymes endocellulaires contribuant à l'affinage. Le caractère protéolytique de certains Microcoques est bien connu (22, 23, 24, 50), ainsi que l'action stimulante des levures sur le développement et l'activité de ces microorganismes.

La corrélation entre le pH et le peuplement microbien est étroite : on a noté une augmentation très nette de la quantité des bactéries protéolytiques en fin d'affinage, et, par suite, une augmentation de pH particulièrement dans la "morge" où la dégradation de la caséine est intense.

Ces faits sont moins marqués au centre du fromage mais la multiplication des Microcoques va de paire avec l'augmentation de pH.

On ne peut, néanmoins, parler de succession de flores distinctes : elles évoluent dans le temps en fonction des étapes technologiques et font à leur tour évoluer le pH permettant lors l'implantation d'une microflore majeure mais, jusqu'au bout de l'affinage, elles restent toutes présentes. On a ainsi, constamment, plusieurs microflores en concurrence et en équilibre dans le milieu.

Les différences quantitatives de population sont très marquées entre la surface et le centre du fromage, mais qualitativement, elles évoluent dans le même sens. La partie superficielle est beaucoup plus riche en microorganismes protéolytiques (pigmentés en général) et lipolytiques responsables de la formation de la "morge" et en rapport avec le caractère centripète de la protéolyse et de la lipolyse.

En conclusion, les interactions entre les différentes espèces bactériennes entraînent des changements chimiques dans le fromage, en dégradant les protéines, les lipides, et aussi, en produisant des substances extracellulaires qui donnent le goût et la texture caractéristiques du fromage.

C H A P I T R E V

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE D'EPOISSES : SES ESPECES DOMINANTES.

I INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent nous avons étudié l'importance relative des grands groupes microbiens appartenant à la flore du fromage d'Epoisses et précisé l'évolution de ces groupes au cours de la maturation. Afin de compléter cette étude essentiellement quantitative, qui ne donnait qu'une image globale et incomplète, il nous a paru utile de déterminer quelles étaient les espèces microbiennes les plus représentatives de chacun des groupes dénombrés.

II PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 - Isolement des souches

Les isolements ont été effectués à partir d'une série de 5 échantillons ayant atteint des stades de maturation différents. Sur chaque échantillon, comportant 2 essais, les groupes microbiens suivants ont été dénombrés par ensemencement sur milieux sélectifs : les streptocoques, les lactobacilles, les microcoques et autres bactéries halophiles, les levures.

Les Streptocoques proviennent de 5 échantillons de la même série pris à des stades de maturation différents. Les colonies ont été prélevées soit sur le milieu à l'acétate de thallium , soit sur une gélose nutritive.

Afin d'obtenir une image aussi représentative que possible de la flore, 50 souches de chaque groupe microbien ont été isolées, 10 souches par échantillon. Cependant, en raison de leur faible importance numérique, 20 souches

seulement de lactobacilles ont été retenues.

Une colonie, prélevée au hasard sur la boîte convenable de milieu sélectif, est ensemencée sur bouillon nutritif et le milieu est mis à incuber 24 heures à 30°C ou 37°C. Sur la culture obtenue, un nouvel isolement est effectué par ensemencement en stries à la surface d'une gélose nutritive. Une colonie isolée est ensuite ensemencée en milieu liquide, et celui-ci est mis à incuber 18 à 24 heures à 30°C ou 37°C. La culture pure obtenue est repiquée sur milieu gélosé et, après développement conservée à + 4°C.

2 - Caractérisation des souches

Avant de procéder à la caractérisation de l'espèce, chaque souche est ensemencée 2 fois, à 24 heures d'intervalle, sur bouillon nutritif et les milieux d'identification sont inoculés avec une culture de 24 H. Sur les cultures bactériennes, un examen microscopique avec coloration de Gram et une recherche de catalase ont permis de confirmer le classement des souches dans les groupes streptocoques, lactobacilles ou microcoques.

-a) Streptocoques

Pour l'identification de ce groupe bactérien, les caractères physiologiques et biochimiques suivants ont été étudiés :

- production de gaz à partir de glucose
- désamination de l'arginine
- croissance à 10°C et 45°C
- thermorésistance à 63°C pendant 30 mn
- résistance à diverses concentrations en NaCl : 2,3, 4 et 6,5%
- action sur le lait de SHERMAN
- fermentation des sucres : glucose, lactose, maltose; mannitol, saccharose, raffinose, sorbitol
- production d'acétoïne sur milieu citrate-lactose
- hydrolyse de l'esculine
- hémolyse sur gélose au sang
- culture en milieu hyperalcalin pH = 9,6

- culture en milieu hyperbilié
- culture sur gélose au tellurite de K
- culture sur milieu de BARNES

-b) Lactobacilles

Pour la détermination de ce groupe, ont été recherchés les caractères suivants :

- production de gaz à partir du glucose
- désamination de l'arginine
- croissance à diverses températures : 15, 45 et 48°C
- thermorésistance à 60°C pendant 90 mn et 65°C pendant 30 mn
- résistance à diverses concentrations en NaCl : 2,4 et 6%
- fermentation des glucides : glucose, lactose, maltose, mannitol, saccharose et raffinose.

En parallèle avec les caractères pré-cités, nous avons identifié les Lactobacilles par une méthode apportant de nombreux caractères complémentaires. Il s'agit de l'API SYSTEM LACTOBACILLUS (commercialisé par l'Institut Pasteur).

API SYSTEM LACTOBACILLUS

L'API SYSTEM LACTOBACILLUS est un procédé d'identification des lactobacilles selon leurs caractères culturaux et biochimiques. Il peut être également utilisé pour l'identification des Streptocoques lactiques et des Leuconostoc (Betacocci).(75).

Il est prêt à l'emploi et, employé dans des conditions expérimentales précises, il peut permettre de surveiller en permanence la production industrielle d'une façon simple, rapide et économique.

. Matériel

Le matériel employé est constitué de plaques supportant de petits tubes en matière plastique transparente, disposés en séries continues, numérotées de 0 à 49. Ces tubes d'une contenance de 0,12 ml, sont terminés par des orifices largement ouverts en forme de cupules d'un volume de 0,24 ml. En ne remplissant que le microtube, on étudiera les fermentations, en remplissant microtube et cupule on pourra observer un développement ou un métabolisme en aérobiose.

. Principe

C'est un matériel normalisé, mais pour obtenir des résultats reproductibles, il est nécessaire de rester dans des conditions expérimentales identiques. Il faut donc utiliser lors des répétitions les mêmes milieux de culture et d'identification, faire cultiver et identifier les souches dans les mêmes conditions de température et de durée, enregistrer les résultats de l'identification selon la même notation.

Ces conditions sont généralement faciles à réaliser et le mode d'emploi est simple :

- la culture de Lactobacilles en phase de croissance exponentielle est lavée par centrifugation,
- avec le culot obtenu, on prépare dans le milieu d'identification une suspension de bactéries définie par sa densité optique ou par la numération,
- la suspension est répartie facilement sous le même volume dans les tubes de la plaque API SYSTEM LACTOBACILLUS,
- on enregistre au cours de l'incubation la rapidité d'apparition des caractères sous forme de diagramme ou profil
- la comparaison des profils obtenus avec les profils de référence permet de contrôler les souches

. Mode opératoire

-a) culture des souches

Les souches sont cultivées sur le milieu décrit par DE MAN, ROGOSA et SHARPE (21)milieu M R S "complet" :

- polypeptone BBL	10 g
- extrait de viande BBL	10 g
- extrait de levure BBL	5 g
- glucose	20 g
- tween 80	1 ml
- K_2 H PO_4	2 g
- CH_3 COO Na, 3 H_2O	5 g
- citrate triammonique	2 g
- Mg SO_4, 7 H_2O	0,2 G
- Mn SO_4, 4 H_2O	0,05 g
- eau distillée	1 litre

Le pH est de 6,2 à 6,6 avant stérilisation et de 6,0 à 6,5 après stérilisation (120° pendant 15 mn).

On ne doit faire l'identification que sur des souches qui sont en phase de croissance exponentielle.

-b) préparation des suspensions

- milieu de suspension : en principe, le milieu de suspension est identique au milieu de culture, excepté les substances fermentescibles. Par exemple si l'on a cultivé les souches sur milieu MRS "complet", on prépare les suspensions dans le MRS "identification" sans glucose ni extrait de viande.

- centrifugation : la culture est centrifugée à 2500 t/mn pendant 10 mn de façon à ce que les bactéries forment un culot compact et que le surnageant soit clair. Le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 30°C. On centrifuge à nouveau, le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 2 ml de MRS identification à 30°C.

- préparation de suspension de densité connue : nous nous sommes référés à une échelle de Mac FARLAND. Pour la préparer, on introduit différentes quantités de chlorure de baryum à 1% et d'acide sulfurique à 1% dans 10 tubes à essais d'épaisseur uniforme. On verse 0,1 ml de la solution de $BaCl_2$ dans le tube n° 1, 0,2 ml dans le tube n° 2 et ainsi de suite jusqu'au n° 10. On ramène le volume à 10 ml dans chaque tube en ajoutant de l'acide sulfurique. On scelle les tubes et on les agite avant l'emploi. On place la suspension bactérienne à mesurer dans un tube de même diamètre pour faire la comparaison.

A partir du culot de centrifugation lavé, remis en suspension dans 2 ml de MRS identification, on ajoute autant de gouttes de suspension dense (dans 10 ml de MRS identification stérile) qu'il est nécessaire pour obtenir une opacité située entre les tubes 2 et 3 de l'échelle de Mc FARLAND.

- préparation des galeries : les galeries sont stériles et contiennent 49 caractères chacune.

La plaque est posée à l'intérieur d'une boîte en matière plastique transparente dans laquelle on ajoute un peu

d'eau pour saturer l'atmosphère d'humidité.

- inoculation des tubes : avec une pipette Pasteur on prélève la suspension et on remplit tous les tubes en évitant de laisser des bulles.

On ne remplit que le tube (0,12 ml) avec la suspension, excepté le tube n° 49 dont le microtube et la cupule doivent être remplis pour ménager une zône d'aérobiose.

La plaque étant remise horizontalement, on remplit toutes les cupules avec de l'huile de paraffine stérile.

- incubation : les boîtes contenant les plaques inoculées sont fermées et mises à l'étuve à 30°C.

- lecture : on enregistre les résultats à 3, 6, 24 et 48 heures. A chaque lecture, on donne une note de 0 à 5 selon l'intensité des caractères apparus, on donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 2, 3 ou 4 sont données aux réactions intermédiaires.

La notation est la suivante :

0 = négatif
1 = douteux faible
2 = douteux positif
3 = positif, faible mais incontestable
4 = positif
5 = très positif

- transformation en profil : au lieu de donner une note, on peut simplement noircir la colonne correspondant à chaque caractère à partir de l'heure où la note 3 est donnée. On obtient ainsi directement le profil.

La réduction des nitrates et la formation d'acétoïne seront révélées à la dernière lecture, car les réactions interfèrent sur les autres réactions décrites ci-dessus.

. Lecture des caractères

- caractères 0 à 39 - fermentations et croissances

La formation d'acide précède la croissance et elle est plus facile à lire dans le 6 premières heures. On enregistre à 3 et 6 heures le virage du pourpre de bromocrésol du pourpre au jaune. Ce virage est noté comme nous l'avons indiqué précédemment de 0 à 5 par rapport au témoin 0 qui doit rester pourpre. On donne la note 3 aux caractères positifs faibles mais indiscutablement positifs.

A la 24ème heure, on observe également, par transparence, sur fond noir la croissance bactérienne qui forme un dépôt opaque sur le fond du tube en se superposant aux fermentations. Avec certaines espèces parmi les Thermobacterium la croissance est quelquefois plus nette que le virage de l'indicateur.

Formation de gaz : les hétérofermentaires donnent des gaz qui forment de petites bulles sous la paroi supérieure des tubes à la 6ème et à la 24ème heure d'incubation. Certaines espèces donnent plus de gaz avec la maltose qu'avec le glucose et la formation de bulles peut être observée au cours de la fermentation d'autres glucides. La formation de gaz obéit au même mécanisme d'hétérofermentation et sera enregistrée sous le n° 41.

Les lectures à 3, 6 et 24 heures doivent permettre le diagnostic et il n'y a de toute façon pas lieu de poursuivre l'enregistrement des fermentations au-delà de 48 heures d'incubation.

Réaction POSITIVE : JAUNE croissance — Réaction NEGATIVE : POURPRE absence de croissance

- caractère 40 - Arginine dihydrolase

Cette dihydrolase caractéristique des hétérofermentaires peut apparaître dès la 6ème heure, elle est franche à 24 heures. L'arginine subit une première réaction dans laquelle elle est décarboxylée en agmatine. Une dihydrolase transforme secondairement l'agmatine en putrescine. Sa présence (réaction positive) entraîne le virage de l'indicateur de pH, le rouge du phénol, du jaune au rouge. La réalisation de ce caractère est obtenue en associant à l'arginine monochlorhydrate 0,1 M, un tampon phosphate de Sorensen à pH 5,6 M/15 qui maintient dès le départ une coloration jaune de l'indicateur et du glucose 0,1 M, nécessaire au fonctionnement de dihydrolase des Lactobacilles.

Réaction POSITIVE : ROUGE — Réaction NEGATIVE : JAUNE

- caractères 41 - témoin culture et formation de gaz

Le tube contient du glucose et de l'extrait de viande de façon à reconstituer le milieu MRS "complet". Il sert de témoin de croissance pour les épreuves d'inhibition

par le Teepol (tubes n° 42 et 43) et par le NaCl (tubes n°44, 45 et 46). Il contient du pourpre de bromocrésol et on observe à la fois le virage de l'indicateur au jaune et la croissance bactérienne par la formation d'un dépôt opaque. Les hétérofermentaires produisent des bulles dans ce tube et l'on doit veiller à ne pas en former artificiellement lors de l'inoculation. On enregistre sous ce numéro la formation de gaz observée par la fermentation d'autres glucides en particulier le maltose.

Réaction POSI TIVE : formation de gaz

Réaction NEGATIVE : absence de gaz

- caractères 42 et 43 - Inhibition par le Teepol

Lorsque ces tubes sont remplis de suspension bactérienne ils contiennent une concentration de 0,4% de Teepol pour le tube n°42 et de 0,6% pour le tube n°43. Le tube n°43 à 0,6% de Teepol donne un aspect quantitatif à cette inhibition, certaines espèces qui résistent bien au Teepol cultivent dans les deux concentrations. Ces tubes contiennent du glucose et du pourpre de bromocrésol et l'experience a montré que l'inhibition de la fermentation est superposable à l'inhibition de la croissance que l'on peut observer par transparence.

On enregistre à 3,6 et 24 heures le virage du pourpre de bromocrésol du pourpre au jaune et à 24 heures la croissance par comparaison avec le tube n°41 qui sert de témoin. Le virage de l'indicateur et la croissance sont lus : réaction positive.

Réaction POSITIVE : JAUNE et croissance

Réaction NEGATIVE : POURPRE absence de croissance

- caractères 44, 45, 46 - Inhibition par NaCl

Remplis de suspension bactérienne, le tube n°44 contient 4% du NaCl, le tube n° 45, 6% et le tube n°46, 10%.

On enregistre à 3, 6 et 24 heures, à l'exemple des caractères 42 et 43, le virage du pourpre de bromocrésol du pourpre au jaune et, à 24 heures la croissance par rapport au témoin, tube n°41.

- caractère 47 - Recherche d'une beta-galactosidase

L'hydrolyse par une beta-galactosidase du substrat synthétique l'O.N.P.G. entraîne une coloration jaune du tube qui s'observe rapidement dès la 3ème heure.

Réaction POSITIVE : JAUNE

Réaction NEGATIVE : INCOLORE

- caractère 48 - Réduction du nitrate de potassium

La réduction du nitrate en nitrite en présence de glucose doit toujours rester négative. Une réaction positive laisse supposer que l'on a affaire soit à une souillure soit à une espèce n'appartenant pas au genre Lactobacillus.

On emploie, selon la méthode habituelle, la réaction de Griess pour la mise en évidence des nitrites. Les réactifs ne doivent être ajoutés qu'après la dernière lecture, les vapeurs acides dégagées par les réactions modifient toutes les autres réactions.

Réaction POSITIVE : ROUGE Réaction NEGATIVE : INCOLORE

- caractère 49 - Formation d'acétoïne

Ce caractère qui permet de repérer certaines espèces est recherché à partir de l'acide pyruvique comme substrat. La formation d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) est favorisée par l'aérobiose, c'est pourquoi il est nécessaire de remplir le tube et la cupule de suspension de bactéries.

Après 48 heures ou 24 heures d'incubation, on ajoute :

- une goutte de KOH à 40%
- une goutte d'alpha naphtol à 1%

Après une dizaine de minutes, on obtient une coloration rouge qui apparaît d'abord dans la cupule s'il y a formation d'acétoïne.

Réaction POSITIVE : ROUGE Réaction NEGATIVE : INCOLORE

Le tableau III dresse la liste des caractères biochimiques et l'objet des recherches.

TABLEAU III

LACTOBACILLES — LISTE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES

N°	Substrats	Réactifs à ajouter		Objet de la recherche	Réaction positive	Réaction négative
0	Pourpre de Bromocrésol (BCP)		néant	TEMOIN	reste	pourpre
1	Glycérol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
2	Erythritol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
3	d(-)arabinose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
4	l(+)arabinose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
5	Ribose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
6	d(+)xylose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
7	l(-)xylose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
8	Adonitol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
9	Méthyl-xyloside	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
10	Galactose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
11	d(+)glucose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
12	d(-)levulose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
13	d(+)mannose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
14	l(-)sorbose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
15	Rhamnose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
16	Dulcitol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
17	Méso-inositol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
18	Mannitol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
19	Sorbitol	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
20	Méthyl-d-mannoside	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
21	Méthyl-d-glucoside	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
22	N acétyl-glucosamine	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
23	Amygdaline	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
24	Arbutine	citrate de fer + BCP	néant	acidification-réduction	jaune-noir	pourpre
25	Esculine	citrate de fer	néant	réduction	noir	incolore
26	Salicine	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
27	d(+)cellobiose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
28	Maltose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
29	Lactose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
30	d(+)mélibiose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
31	Saccharose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
32	d(+)tréhalose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
33	Inuline	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
34	d(+)mélézitose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
35	d(+)raffinose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
36	Dextrine	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
37	Amylose	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
38	Amidon	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
39	Glycogène	BCP	néant	acidification	jaune	pourpre
40	Arginine	rouge de phénol	néant	arginine dihydrolase	rouge	jaune
41	Glucose	BCP	néant	formation de gaz (+ témoin croissance)	bulles	absence de bulles
42	Teepol 0,4 %	BCP	néant	inhibition croissance	croissance jaune	inhibition pourpre
43	Teepol 0,6 %	BCP	néant	inhibition croissance	croissance jaune	inhibition pourpre
44	NaCl 4 %	BCP	néant	inhibition croissance	croissance jaune	inhibition pourpre
45	NaCl 6 %	BCP	néant	inhibition croissance	croissance jaune	inhibition pourpre
46	NaCl 10 %	BCP	néant	inhibition croissance	croissance jaune	inhibition pourpre
47	O.N.P.G.		néant	bêta galactosidase	jaune	incolore
48	Nitrate de potassium + glucose		réactifs des nitrites	nitrites	rouge	incolore
49	Acide pyruvique		KOH + alpha naphtol	acétoïne	rouge	incolore

B.C.P. = Brom Cresol Purple

O.N.P.G. = Ortho nitrophényl bêta d pyranogalactoside

Ne remplir que les tubes avec la suspension de Lactobacilles dans le milieu MRS identification.

Le N° 49 doit être rempli complètement, tube et cupule.

Remplir la cupule d'huile de paraffine stérile du N° 0 au N° 47 inclus. Les N° 48 et 49 ne seront pas mis sous huile de paraffine pour permettre l'addition des réactifs.

Dans tous les cas, sauf pour les N° 40 (arginine), 47 (ONPG), 48 (nitrate) et 49 (acide pyruvique), enregistrer le virage de l'indicateur et la croissance des bactéries (formation d'un dépôt opaque).

. Interprétation des résultats

Les 49 caractères ont été choisis pour permettre le diagnostic des sous-genres, des espèces et la reconnaissance d'une souche d'après son profil.

Diagnostic des sous-genres

Caractère	Thermobacterium	Streptobacterium	Betabacterium
n°5 ribose	-	+	+
n°40 arginine	-	-	+
n°41 gaz en glucose	-	-	+

Diagnostic des espèces

On se reportera aux tableaux des caractères différentiels donnés par PAULE R. (75).

Pour chaque profil les caractères distinctifs d'espèce sont repérés par des symboles :

- un triangle noir pour les caractères positifs
- un triangle blanc pour les caractères négatifs

Diagnostic d'une souche

Le profil d'une souche doit rester identique à lui-même au cours des essais.

-c) Microcoques et autres bactéries halophiles

De nombreuses clés ont été proposées pour l'identification des coques à coloration de Gram positive et producteurs de catalase.

Nous avons adopté la récente classification de BAIRD-PARKER (6), qui, dans le genre Micrococcus, distingue 2 groupes sur la base de l'aptitude à la fermentation ou à l'oxydation du glucose : les Staphylocoques et les Microcoques

Les premiers produisent de l'acide en anaérobiose à partir du glucose ; les seconds ne possèdent pas cette propriété.

Le groupe des Staphylocoques comprend 6 sous-groupes celui des Microcoque 7. (Voir tableau IV).

TABLEAU IV

1)

CARACTERES	SOUS-GROUPES I	II	III	IV	V	VI
coagulase	+	-	-	-	-	-
phosphatase	+	+	+	-	-	-
mannitol (oxydation)	+ (souvent)	-	-	-	-	+
mannitol (fermentation)	+ (souvent)	-	-	-	-	- (souvent)
acétoïne	+	+	-	+	+	+
lactose	+ (souvent)	+ (souvent)	v	-	+	v
maltose	+	+	-	v	+	v
croissance à 10°C	+ (souvent)	-	-	-	-	- (souvent)

v = variable

PRINCIPAUX CARACTERES DES SOUS-GROUPES DU GROUPE I (STAPHYLOCOQUES)

2)

CARACTERES	SOUS - GROUPES 1	2	3	4	5	6	7
acide à partir du glucose	+	+	+	+	+	+	-
phosphatase	-	-	-	-	-	+	-
acétoïne	+	+	+	-	-	-	-
pH final sur milieu glucosé à 2%	4,6	5,1	5,0	5,2	5,5	5,3	6,5
arabinose	-	-	-	+	v	+	-
lactose	-	+	v	+	+ (souvent)	+	-
maltose	v	+	+ (souvent)	+	+ (souvent)	+	-
mannitol	-	-	+	+	+ (souvent)	+	-
lipolyse	v	+	+	-	- (souvent)	+ (souvent)	v
hydrolyse du tween	- (souvent)	-	v	-	-	+	v
croissance à 10°C	- (souvent)	+ (souvent)	+ (souvent)	+	+ (souvent)	+	+ (souvent)

= variable

PRINCIPAUX CARACTERES DES SOUS-GROUPES DU GROUPE 2 (MICROCOCCUS)

La classification en groupes et sous-groupes est fondée sur les caractères suivants :

- aptitudes à l'oxydation et à la fermentation des sucres.

Par ensemencement sur milieu nutritif gélosé à 0,2% et contenant 1% du sucre étudié, on recherche l'aptitude à la production d'acide en aérobiose à partir du glucose, du mannitol, du lactose, de l'arabinose et du maltose.

Sur des tubes du même milieu recouverts d'un disque de paraffine on met en évidence l'aptitude à la fermentation du glucose et du mannitol en anaérobiose.

- production de coagulase

A 0,3 ml de plasma de lapin on additionne 0,1 ml d'une culture de 24 heures sur milieu "Brain Heart Infusion" (Difco B 37) ; le mélange est mis à incuber à 35°C et examiné après 1 heure et 3 heures.

- production de phosphatase

Les souches sont ensemencées sur milieu gélosé additionné de 0,1 pour 1000 de phenolphtaléine-phosphate disodique ; après incubation, la libération de phénolphtaléine est décelée en atmosphère ammoniacale.

- production d'acétoïne à partir du glucose
- croissance à 10°C

En outre, certains caractères distinctifs utilisés dans la classification de BERGEY ont été étudiés :

- production de nitrites à partir des nitrates
- hydrolyse de l'urée
- action sur le lait tournesolé
- liquéfaction de la gélatine
- digestion de la caséine

-d) Levures

En ce qui concerne les levures les caractères suivants ont été étudiés :

- aptitude à la sporulation

Les résultats obtenus sur les cultures en milieux pauvres traditionnels (gélose de Gorodkova et blocs de plâtre), étaient souvent difficilement interprétables. Pour toutes les souches, l'aptitude à la formation des spores a été recherchée sur des cultures âgées.

- aspect des cultures en milieu liquide

Présence d'un voile ou d'un dépôt en culture plus ou moins âgée

- morphologie de la cellule
- aspect et forme des colonies sur milieu gélosé
- aptitude à la fermentation et à l'assimilation des sucres

Pour l'identification des levures nous nous sommes inspirés d'une méthode mise au point par CHARPENTIER Cl. et BERGERET J. (14), basée sur le principe utilisé précédemment pour les Lactobacilles. Elle consiste à normaliser les épreuves d'identification des levures et à simplifier leur mise en oeuvre à l'aide de microméthodes. Elle permet d'augmenter considérablement le nombre d'informations. Le principe de cette méthode est le suivant : les levures sont cultivées sur un milieu faborable (milieu de WICKERHAM MALT) (97,98). qui doit permettre un taux de croissance identique pour toutes les souches, à la température optimale (27°C) et pendant le temps le plus court (48 heures) pour rester dans la phase de croissance exponentielle. La culture est lavée 3 fois par centrifugation et le dernier culot de centrifugation sert à préparer les suspensions. Seule l'expérience permet de définir les densités optiques (turbidité) optimales donnant des résultats rapides et comparables pour les fermentations, et la possibilité d'observer sans difficulté les croissances pour les assimilations. Cette suspension, en état de non prolifération, est considérée comme un système préformé d'enzymes et agit sur différents substrats. Mais l'identification de certains microorganismes tels que les levures nécessite en plus l'étude des fermentations celle des assimilations des sucres qui se traduisent par une croissance et impliquent par conséquent une culture de ces microorganismes.

Le matériel employé est identique à celui utilisé pour les Lactobacilles, mais les séries sont numérotées de 0 à 99.

La fermentation des glucides est mise en évidence par la formation d'acides, révélée par un indicateur de pH déposé dans les tubes en même temps que les substrats. Pour les levures, on utilise le pourpre de bromocrésol qui vire au jaune à pH 5,6.

L'assimilation des glucides se traduit par une croissance des levures, l'indicateur de pH est donc supprimé. L'ensemble du dispositif est totalement rempli, la concentration finale en sucre sera donc 3 fois moins élevée que dans les cas des fermentations.

Les tableaux V et VI donnent la liste des caractères étudiés.

TABLEAU V

Liste des hydrates de carbone

N° des tubes	Substrats	FERMENTATION Indicateur	objet de la recherche	Réaction positive	Réaction négative	ASSIMILATION Réaction positive	Réaction négative	N° des tubes
0	Témoin	BCP	Témoin		Reste pourpre	Croissance	Pas de croissance	40
1	Glycérol	"	Acidification	Jaune	"	"	"	41
2	Erythritol	"	"	"	"	"	"	42
3	d (-) arabinose	"	"	"	"	"	"	43
4	l (+) arabinose	"	"	"	"	"	"	44
5	Ribose	"	"	"	"	"	"	45
6	d (+) xylose	"	"	"	"	"	"	46
7	l (-) xylose	"	"	"	"	"	"	47
8	Adonitol (ribitol)	"	"	"	"	"	"	48
9	Méthyl-xyloside	"	"	"	"	"	"	49
10	Galactose	"	"	"	"	"	"	50
11	d (+) glucose	"	"	"	"	"	"	51
12	d (-) levulose	"	"	"	"	"	"	52
13	d (+) mannose	"	"	"	"	"	"	53
14	l (-) sorbose	"	"	"	"	"	"	54
15	Rhamnose	"	"	"	"	"	"	55
16	Dulcitol	"	"	"	"	"	"	56
17	Méso-inositol	"	"	"	"	"	"	57
18	Mannitol	"	"	"	"	"	"	58
19	Sorbitol (glucitol)	"	"	"	"	"	"	59
20	Méthyl-d-mannoside	"	"	"	"	"	"	60
21	Méthyl-d-glucoside	"	"	"	"	"	"	61
22	N acéthyl glucosamine	"	"	"	"	"	"	62
23	Amygdaline	"	"	"	"	"	"	63
24	Arbutine + citrate de fer	"	Acidification Réduction	Jaune-noir	"	"	"	64
25	Esculine + citrate de fer	"	Réduction	noir	incolore	"	"	65
26	Salicine	"	Acidification	Jaune	pourpre	"	"	66
27	d (+) cellobiose	"	"	"	"	"	"	67
28	Maltose	"	"	"	"	"	"	68
29	Lactose	"	"	"	"	"	"	69
30	d (+) mélibiose	"	"	"	"	"	"	70
31	Saccharose	"	"	"	"	"	"	71
32	d (+) tréhalose	"	"	"	"	"	"	72
33	Inuline	"	"	"	"	"	"	73
34	d (+) mélézitose	"	"	"	"	"	"	74
35	d (+) raffinose	"	"	"	"	"	"	75
36	Dextrine	"	"	"	"	"	"	76
37	Amylose	"	"	"	"	"	"	77
38	Amidon	"	"	"	"	"	"	78
39	Glycogène	"	"	"	"	"	"	79

TABLEAU VI

Autres caractères biochimiques

n° des tubes	Substrats	Indicateur	Objet de la recherche	Réaction positive	Réaction négative
80	Gélatine de Kohn	-	Gélatinolyse	Particules de charbon	incolore
81	Glucose sans indicateur de pH	-	Voile	Voile	rien
82	O N P G	-	Beta-galactosidase	Jaune	incolore
83	Glucose + résazurine	Résazurine	Oxydo-réduction	Réduction : rose	Oxydation : bleu
84	Glucose + TTC	TTC	Réduction	Réduction : rose	Oxyd. incolore
85	Acide D L lactique	-	Assimilation	Croissance	Pas de croissance
86	Acide malique	-	"	"	" "
87	Acide pyruvique	-	"	"	" "
88	Acide tartrique	-	"	"	" "
89	Acide succinique	-	"	"	" "
90	Acide citrique	-	"	"	" "
91	Actidione+glucose	-			
92	NaCl 4% + glucose	-	Inhibition - croissance	"	Inhibition
93	NaCl 6% + glucose	-	"	"	"
94	Ethanol (1)	-	"	"	"
95	Nitrate de sodium	-	Assimilation	Croissance	Pas croissance
96	Nitrite de sodium	-	"	"	"
97	Chlorhydrate d'éthylamine	-	"	"	"
98	L lysine	-	"	"	"
99	Urée	rouge de phénol	Uréase	Rouge	Jaune

(1) Pour le tube éthanol ajouter 3 ul alcool absolu + 30 ul d'acool à 10°

Le tableau VII donne les clés d'identification des levures suivant un schéma proposé par BEECH F.W. et DAVENPORT R.R. (1968). (8).

La miniaturation du matériel permet de faire subir systématiquement à toutes les souches les mêmes épreuves.

La normalisation est obtenue par l'emploi des quantités de substrats bien définies et une préparation bien codifiée des suspensions.

Les résultats sont alors reproductibles et en conformité avec ceux des méthodes classiques.

TABLEAU VII

Clé d'identification des levures (BEECH-DAVENPORT)

1 - Fermentation des glucides

O	Glucose non fermenté
D	glucose fermenté
G	glucose et galactose fermentés
M	glucose et maltose fermentés
S	glucose et saccharose fermentés
MS	glucose, maltose et saccharose fermentés
A	glucose, saccharose et raffinose fermentés
MA	glucose, maltose, saccharose et raffinose fermentés
MB	glucose, maltose, saccharose, raffinose et mélibiose fermentés
B	glucose, saccharose, raffinose et mélibiose fermentés
GM	glucose, galactose et maltose fermentés
GS	glucose, galactose et saccharose fermentés
GA	glucose, galactose, saccharose et raffinose fermentés
GB	glucose, galactose, saccharose, raffinose et mélibiose fermentés
GMS	glucose, galactose, maltose et saccharose fermentés
GMA	glucose, galactose, maltose, saccharose et raffinose fermentés
GMB	glucose, galactose, maltose, saccharose, raffinose et et mélibiose fermentés
GL	glucose, galactose et lactose fermentés
GML	glucose, galactose, maltose et lactose fermentés

GAL glucose, galactose, saccharose, raffinose et lactose fermentés

GMAL glucose, galactose, maltose, saccharose, raffinose et lactose fermentés

2 - Assimilation des nitrates

N assimilation des nitrates comme seule source d'azote

O non assimilation des nitrates

3 - Assimilation des glucides

1 glucose assimilé

1 M glucose et maltose assimilés

1 ML glucose, maltose et lactose assimilés

1 L glucose et lactose assimilés

1 S glucose et saccharose assimilés

1 SL glucose, saccharose et lactose assimilés

1 SM glucose, saccharose et maltose assimilés

1 SML glucose, saccharose, maltose et lactose assimilés

2 glucose et galactose assimilés

2 M glucose, galactose et maltose assimilés

2 ML glucose, galactose, maltose et lactose assimilés

2 L glucose, galactose et lactose assimilés

3 glucose, galactose et saccharose assimilés

3 L glucose, galactose, saccharose et lactose assimilés

4 glucose, galactose, saccharose et maltose assimilés

5 tous les sucres assimilés sauf le raffinose

4 - Morphologie

FF reproduction par scission

BB bourgeonnement bipolaire

TRI bourgeonnement triangulaire

I bourgeonnement multilatéral, pas de pseudomycelium, pas de voile

2 bourgeonnement multilatéral, pseudomycelium, voile

2A bourgeonnement multilatéral, pas de pseudomycelium, voile

2B bourgeonnement multilatéral, pseudomycelium, pas de voile

CAPS présence de capsule

COL pigmentation

Ordre séquentiel du code :

1 - Fermentation des glucides
2 - Assimilation des nitrates
3 - Assimilation des glucides
4 - Morphologie

Exemples : *Saccharomyces lactis* = GAL / 05 / 2A
Saccharomyces fragilis = GAL / 03L / 2B

III RESULTATS ET INTERPRETATION

1 - Streptocoques

Sur les 50 couches isolées à partir du milieu à l'acétate de thallium et le Plate Count Agar, 48 présentent les caractères des Streptocoques :

- formes en diplocoques et streptocoques
- coloration de Gram positive
- absence de catalase.

Ces 48 souches se répartissent comme suit :

. 39 souches s'identifient au groupe D des Streptocoques par l'ensemble de leur caractères :

- croissance à 10 et 45°C
- thermorésistance
- réduction du lait au bleu de méthylène avant coagulation
- fermentation du mannitol, saccharose et sorbitol
- tolérance au NaCl 6,5%

Parmi ces 39 souches :

- 18 s'apparentent à l'espèce *Streptococcus faecalis var. faecalis*
- 6 souches se rattachent à l'espèce *Streptococcus faecalis var liquefaciens* ; elles présentent les caractères précédents mais en outre, elles possèdent une gélatinase.
- 15 souches s'identifient à l'espèce *Streptococcus durans* qui possèdent l'ensemble des caractères mais ne fermentent pas le mannitol, le saccharose, le raffinose, le sorbitol.

. 9 souches s'apparentant à l'espèce *Streptococcus*

lactis par l'ensemble de leurs caractères :

- croissance à 10° et non à 45°C
- réduction du lait au bleu de méthylène avant coagulation
- non thermorésistance
- tolérance à 4% de sel mais non à 6,5%
- désamination de l'arginine
- fermentation du maltose

. 2 souches non classées.

Le tableau VIII donne les caractères principaux des Streptococci isolés du fromage d'Epoisses.

TABLEAU VIII

Principaux caractères des Streptococci isolés du fromage d'Epoisses

Caractères	Nombre de souches	18	6	15	9
CROISSANCE	10°C	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	-
LAIT DE SHERMAN		ARC	ARC	ARC	ARC
THERMORESISTANCE (63°C pendant 30 mn)		+	+	+	-
TOLERANCE AU NaCl	2 %	+	+	+	+
	4 %	+	+	+	±
	6,5 %	+	+	+	-
CO_2 à partir du GLUCOSE		+	+	-	-
NH_3 - ARGININE		+	+	+	+
ACETOINE		+	+	+	-
FERMENTATION DES GLUCIDES	LACTOSE	+	+	+	+
	SACCHAROSE	+	+	-	-
	MANNITOL	+	+	-	-
	MALTOSE	+	+	-	+
	RAFFINOSE	-	-	-	-
	SORBITOL	+	+	-	-
GELATINASE		-	+	-	-
HEMOLYSE		-	-	beta	-
ESCULINE		+	+	+	-

ARC = Acidification
Réduction
Coagulation

2 - Lactobacilles

Ce groupe microbien ne représente, dans la flore du fromage d'Epoisses, qu'une population peu nombreuse et, de ce fait, nous n'avons pu étudier que 20 souches. Elles appartiennent au genre Lactobacillus, elles sont en forme de bâtonnets droits ou incurvés, isolés, en chaînes et parfois en filaments, immobiles à coloration de Gram positive ; elles ne possèdent pas de catalase. La gélatine n'est pas liquéfiée. Les glucides sont fermentés avec l'acide lactique comme produit principal. Les glucides subissent soit l'homofermentation lactique, soit l'hétérofermentation acéto-lactique avec production d'alcool et CO_2.

Ces 20 souches se répartissent en 16 souches homofermentaires et 4 souches hétérofermentaires.

Les souches homofermentaires présentent les caractères *Lactobacillus plantarum*. Les souches hétérofermentaires se rattachent, par leurs caractères, à l'espèce *Lactobacillus brevis*.

Les souches de *Lactobacillus plantarum* ont été principalement isolées à la surface et au centre du fromage après salage et au cours de l'affinage.

Le salage des fromages provoque une légère diminution du nombre des Lactobacillus et aussi une sélection parmi ces Lactobacilles. Après salage, nous avons constaté que le nombre des germes totaux augmentait alors que celui des Lactobacilles variait assez peu. Cela peut s'expliquer par le fait qu'après salage, la flore totale à la surface du fromage est constituée principalement de levures et de microcoques plus résistants au sel que les Lactobacilles.

Lactobacillus plantarum (ORLA-JENSEN 1919)

Isolé de produits laitiers ; de végétaux en fermentation ; de matières fécales.

Bâtonnet de 3 à 8 microns sur 0,7 micron, à extrémités arrondies, isolé ou en chaîne. Immobile. Gram positif.

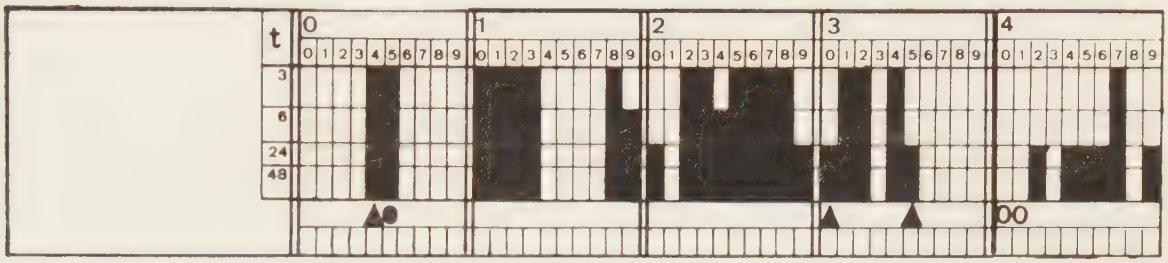
Anaérobie, microaérophile ; température optimum 30°C ; tué à 65°C ; tolère 5,5 % de sel.

Sur gélose inclinée : culture très pauvre ; colonies

très petites. Le bouillon est troublé et s'éclaircit rapidement ; dépôt floconneux. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le lait acidifié et en général coagulé. Il fermente : glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose, raffinose, mannose et parfois sorbitol, mannitol, xylose, dextrine et glycérol.

Il produit à partir des hexoses de l'acide lactique optiquement inactif avec de petites quantités d'acide acétique et de CO_2.

L. plantarum



Profil obtenu avec *Lactobacillus plantarum* par la méthode API SYSTEM LACTOBACILLUS

Lactobacillus brevis (ORLA-JENSEN,1919)

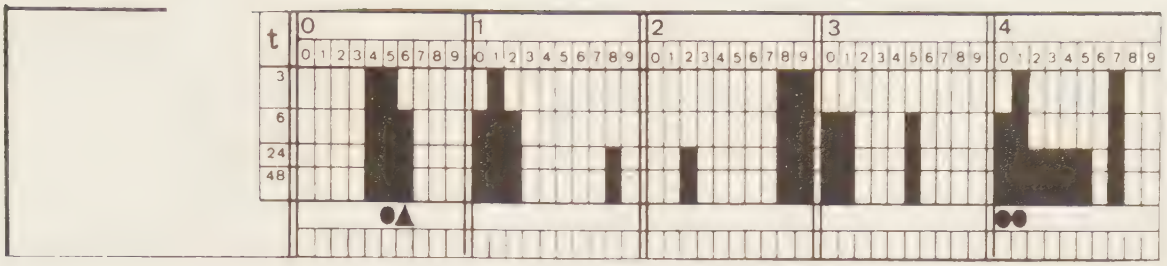
Isolé de lait, fromage, kefir, choucroute, ensilage, fumier, fécès, sol et produits végétaux fermentés.

Bâtonnet de 2 à 4 microns sur 0,7 micron ; à bouts arrondis, isolé courtes chaînes et parfois filaments avec granulations. Immobile, Gram positif.

Anaérobie facultatif ; température 30°C.

Sur gélose inclinée : culture très pauvre ; colonies rares et minuscules. Le bouillon est troublé puis s'éclaircit. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le lait est acidifié mais rarement coagulé. Le lactate de Ca est utilisé ; la caséine n'est pas utilisée. Il fermente glucose, levulose, galactose, maltose, xylose, arabinose ; quelques souches fermentent : lactose, saccharose, mannose et raffinose. Il produit de l'acide lactique optiquement inactif. A partir des aldohexoses il produit de plus : acide acétique, éthanol et CO_2.

L. brevis



Profil obtenu avec *Lactobacillus brevis* par la méthode API SYSTEM LACTOBACILLUS

3 - Microcoques et autres bactéries halophiles

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté une nette prédominance des microcoques de plus en plus marquée au fur et à mesure que la durée d'affinage se prolongeait.

Sur les 50 souches isolées, 46 se classent dans le genre Micrococcus :

- cocci à coloration de Gram positive
- catalase (+)

6 souches sont aptes à fermenter le glucose en anaérobiose ; elles se rattachent au groupe des Staphylocoques.
30 souches ne possèdent pas cette propriété : elles appartiennent au groupe des Microcoques (critères de classification définis par BAIRD-PARKER en 1963).

. les 6 souches du groupe des Staphylocoques se répartissent ainsi :

5 souches s 'apparentent au sous-groupe VI (coagulase (-), phosphatase (-), mannitol (+)) ;
1 souche appartient au sous-groupe II (coagulase (-), phosphatase (+), acétoïne (+).

. la répartition des 30 souches du groupe des Microcoques est la suivante :

4 souches se classent dans le sous-groupe 1
12 souches appartiennent au sous-groupe 2
6 souches se rattachent au sous-groupe 3
2 souches s'apparentent au sous-groupe 3
6 souches se classent dans le sous-groupe 7

Il résulte de ceci que :

- 40% des Microcoques isolés appartiennent au sous-groupe 2
- 20% au sous-groupe 3
- 20% au sous-groupe 7
- 13,3% au sous-groupe 1
- 6,6% au sous-groupe 4

Il est difficile d'établir une relation entre la classification de BAIRD-PARKER (6) et celle de BERGEY (8) . Des souches présentant les caractères d'une espèce-type selon BERGEY peuvent, en effet, se classer d'après BAIRD-PARKER dans des groupes et sous-groupes différents.

Néanmoins, certaines espèces sont dominantes et, sur la base des caractères distinctifs des espèces du genre Micrococcus, nous avons pu identifier :

Micrococcus conglomeratus
Micrococcus caseolyticus
Micrococcus flavus
Micrococcus cryophilus

Ces espèces représentent près de la moitié des souches caractérisées précédemment.

Les 14 souches isolées sur milieu de CHAPMAN et non classées dans le genre Micrococcus appartiennent pour près de 50% (8 sur 14) au genre Sarcina.

Il s'agit de *Sarcina lutea* qui donne des colonies jaunes, granuleuses, rondes, surélevées, humides et brillantes.

Dans les 50% restant, nous avons trouvé également des souches pigmentées. Nous avons été aidés, pour leur identification, par M. le Professeur BRISOU (CHU de Poitiers) que nous tenons vivement à remercier.

Ces souches ont été caractérisées comme suit :

Mycococcus capsulatus variété rouge
Brevibacterium erythrogenes
Microbacterium flavum
Brevibacterium groupe ammoniagenes

Ces espèces nous paraissent intéressantes car pigmentées. Elles sont apportées par la saumure où elles ont été retrouvées

par l'analyse microbiologique.

Dans l'ensemble, ce sont des germes très protéolytiques et les Brevibacterium sont des organismes essentiels dans la phase finale de l'affinage de quelques fromages à pâte molle, (1), ils sont producteurs d'amines (92).

Ils sont souvent en association avec des levures (cas de l'Epoisses). Ces dernières augmentent le pH, jusque là défavorable à la culture des Brevibacterium, et elles synthétisent des facteurs de croissance qui semblent indispensables à ces germes (en particulier l'acide panthoténique (80

Les germes ont été isolés après le salage et sont présents jusqu'en fin d'affinage.

4 - Les levures

Ces 50 souches de levures isolées à partir du milieu "Potato Dextrose Agar", se répartissent comme suit ;

. 28 d'entre elles appartiennent à l'espèce *Saccharomyces lactis* (soit 56% au total) :

- elles fermentent : glucose, galactose, saccharose, raffinose, et lactose
- elles n'assimilent pas les nitrates
- elles assimilent tous les sucres sauf le raffinose
- elles présentent des bourgeons multilatéraux
- elles ne forment pas de pseudomycelium
- elles forment un voile en culture.

. 14 souches ont été identifiées comme étant des *Saccharomyces fragilis* :

- elles ont les caractères précédents mais leur différence provient de la non assimilation du maltose.

Elles représentent 28% de la flore totale des levures.

. Très proche des précédentes, nous trouvons une souche de *Saccharomyces marxianus* :

- à la différence de Saccharomyces lactis, elle ne fermente pas le lactose.

. Parmi les Saccharomyces, une autre souche a été identifiée comme présentant les caractères de *Saccharomyces microellipsodes*.

- elle fermente : glucose, saccharose, raffinose et mélibiose
- elle n'assimile pas les nitrates.
- elle assimile : glucose, galactose et saccharose
- elle présente des bourgeons multilatéraux
- elle ne forme pas de pseudomycelium, ni de voile en culture.

. Les 6 souches restantes sont des asporogènes et ne présentent qu'un pouvoir fermentaire peu étendu. Par leurs caractères, elles se rattachent au groupe des Candida :

- le glucose n'est pas fermenté
- les nitrates et le glucose non assimilés
- présence de bourgeons multilatéraux
- formation de pseudomycelium et de voile en culture,

Il s'agit de *Candida lipolytica*.

En conclusion, nous voyons que 2 grands groupes de levures sont présents :

- le genre Saccharomyces, par son aptitude à la sporulation et son pouvoir fermentaire, représente 88% du total de la flore levuriforme.
- le genre Candida, ne possèdant aucune aptitude à la fermentation compose les 12% restant.

Les Saccharomyces lactis sont présents d'un bout à l'autre de la fabrication et ne sont pas affectés par le salage. Leur évolution est très rapide, en surface du fromage, jusqu'au 25ème jour.

Nous n'avons trouvé aucune souche pigmentée du genre Rhodotorula, par exemple.

Le tableau IX donne les principaux caractères des levures isolées du fromage d'Epoisses.

TABLEAU IX

FERMENTATION	Sacch. lactis	Sacch. marxianus	Sacch. microellips	Sacch. fragilis	Candida lipolytica
- Glucose	+	+	+	+	-
- Galactose	+	+	+	+	-
- Saccharose	(+)	+	+	+	-
- Maltose	(+)	-	-	-	-
- Cellobiose	-	-	-	-	-
- Trehalose	(+)	-	(+)	-	-
- Lactose	+	-	-	rapide	-
- Melibiose	-	-	+		-
- Raffinose	(+)	+	+	+	-
- Melezitose	(+)	-	-	-	-
- Inuline	-	+	+	+	-
- Amidon	-	-	-	-	-
- Methyl d Glucoside	-	-	-	-	-
ASSIMILATION					
- Glucose	+	+	+	+	+
- Galactose	+	+	+	+	-
- L Sorbose	(+)	(+)	+ -	+ -	+ (-)
- Saccharose	+	+	+	+	-
- Maltose	(+)	-	-	-	-
- Cellobiose	+	+	-	+	-
- Trehalose	+	-	+	-	-
- Lactose	+	+	-	+	-
- Mélibiose	-	raff +	+	-	-
- d Ribose	-	+ -	-	+ -	-
- l Rhamnose	-	-	-	-	-
- Ethanol	+	+	+	+	+
- Glycerol	+	+	+ -	+	+
- Erythritol	-	-	-	-	+
- Ribitol	(+)	+	-	rarement	-
- Galactitol	-	-	-	-	-
- D Mannitol	+	+	+	+	+
- d Glucitol	+	+	+	+	-
- Raffinose	(+)	+	+	+	-
- Melezitose	+	-	-	-	-
- Inuline	+ -	+	+	+	-
- Amidon	-	-	-	-	-
- d Xylose	+ -	+	-	+	-
- l Arabinose	-	+	-	+	-
- Methyl d Glucoside	+ -	-	-	-	-
- Salicine	+	+	-	+	-
- Ac. Lactique	+ -	+	+ -	+	+
- Ac. Succinique	+	+	- (+)	+	+
- Ac. Citrique	-	+ -	-	+ -	+
- Inositol	-	-	-	-	-
- Arbutine	+	+	-	+	-
- Chlorhydrate Ethylamine	+	+	+ -	+	-

PRINCIPAUX CARACTERES DES LEVURES

ISOLEES DU FROMAGE D'EPOISSES

IV DISCUSSION DES RESULTATS

Au sein des microflores superficielle et interne du fromage d'Epoisses, les Streptocoques du groupe D sont en proportion très appréciable.

Ceci est intéressant, particulier à ce fromage, et l'emploi dans les levains de fromagerie d'Entérocoques pourrait présenter un certain intérêt du double point de vue de l'accélération du processus d'acidification et du développement des qualités organoleptiques plus satisfaisantes, contribuant utilement à la maturation des fromages et à la formation de l'arôme.

Une étude entreprise par SCHMIDT J.L et LENOIR G. (85) a permis de tirer des conclusions intéressantes quant à l'aptitude à l'acidification et à la production de composants d'arôme (diacetyle, acétoïne, acétaldéhyde) par ces microorganismes.

Les Microcoques constituent une part notable de la flore microbienne de l'Epoisses, plus particulièrement de la flore superficielle en fin de maturation.

Cette population est hétérogène, les souches caractérisées se rattachent en effet, à 5 sous-groupes différents. La répartition est, toutefois inégale. Certains sous-groupes ne sont représentés que par 2 souches, par contre 40% des souches s'apparentent au sous-groupe 2.

Le degré d'affinage semble influer sur la répartition des Microcoques. Dans les caillés et les fromages jeunes, les sous-groupes 2 et 3 forment un plus de 50% de la population. Dans les fromages affinés, aucune souche du sous-groupe 2 n'a été isolée.

Les levures représentent une fraction très importante de la microflore, surtout en fin d'affinage dans la couche superficielle du fromage.

Deux groupes sont présents : les Saccharomyces et les Candida.

Parmi ces microorganismes, il conviendrait de préciser leur rôle dans la maturation et de déterminer leurs activités respectives, et, pour cela, caractériser les enzymes

protéolytiques intracellulaires et extracellulaires d'un certain nombre de souches de chacun des groupes microbiens présents.

Néanmoins, on sait que de nombreux facteurs peuvent modifier l'aptitude des microorganismes à la production d'enzymes ou l'activité de celles-ci.(17).

Les résultats obtenus à partir de souches pures, sur des préparations enzymatiques brutes, et dans des conditions opératoires fort différentes des conditions de l'affinage, ne peuvent avoir qu'une valeur indicative ; leur transposition directe au niveau des fromages en cours de maturation serait donc quelque peu hasardeuse.

Quoi qu'il en soit, ce travail serait à entreprendre de façon à avoir un profil du potentiel protéasique des souches et à connaître le rôle déterminant de certaines d'entre elles.

C H A P I T R E VI

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DU SALAGE DES FROMAGES EN SAUMURE

Le procédé de salage des fromages par saumurage consiste, généralement, à immerger le produit à traiter dans une saumure ayant une concentration fixe en chlorure de sodium, durant un temps donné et à une température donnée.

On sait, que, au cours du séjour des fromages dans cette saumure, il se produit un échange osmotique qui a pour résultat :

- d'une part, une diminution de la concentration en sel résultant de sa pénétration dans le produit à traiter et de la dilution de la saumure par l'eau résultant de l'échange osmotique ;
- d'autre part, une augmentation de la teneur en impuretés de cette saumure.

C'est ainsi que des impuretés minérales sont libérées par le fromage et son apportées par le sel ou par l'eau de dissolution. De même, des impuretés organiques (lactose, acide lactique, etc...) sont libérées par le fromage. Enfin, il se produit un enrichissement bactérien et fongique de la saumure ; cet effet est variable suivant le type de fromage traité.

I LES ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES DU SALAGE EN SAUMURE

Plusieurs types de sel sont actuellement sur le marché. En ce qui concerne l'industrie fromagère, les sels les plus utilisés sont le "super épuré désulfaté" et le "super épuré-super désulfaté". Leur composition chimique type est la suivante :

	Super épuré désulfaté sec	Super épuré-super désulfaté sec
Calcium exprimé en Ca O	0,007 %	0,0021 %
Magnésium exprimé en Mg O	0,0025 %	0,0008 %
Sulfates exprimés en SO_4	0,04 %	0,016 %
Humidité	0,2 %	0,2 %

Du fait de la forte proportion de NaCl dans ces types de sel, nous entendrons, à l'avenir, par le mot "sel" uniquement le chlorure de sodium.

Jusqu'à la saturation correspondant à 330 g de sel, par kg d'eau pure, à la température du 15°C, le sel, de par sa très grande constante de dissociation, est sous forme totalement dissoute. Les échanges existant entre la saumure et les fromages se traduisent donc par des migrations d'ions.

La forte pression osmotique provoquée par la dissolution du sel en grande quantité, donne naissance à 2 courants de déplacement d'ions : l'un s'effectue du fromage vers la saumure et l'autre en sens contraire.

1 - Migration du lactosérum

La phase aqueuse qui exsude du fromage constitue le lactosérum, celui-ci contient des ions se déplaçant dans le même sens que lui. Dès le moulage, le lactosérum migre dans le fromage de l'intérieur vers l'extérieur. Le saumurage, complément de l'égouttage, va provoquer une exsudation supplémentaire de lactosérum.

2 - Migration du calcium

Les changements de teneur en calcium sont essentiels pour la texture de la pâte.

La teneur en calcium total du fromage diminue pen-

dant le saumurage, la plus grande perte provenant principalement des couches externes.

Après le moulage, la décalcification débute dans les couches externes provoquant une augmentation de calcium soluble . Lors de l'égouttage et du saumurage, le lactosérum véhicule celui-ci à l'extérieur du fromage.

D'après les résultats obtenus par GABILLET Cl (44), et relatifs à l'évolution chimique de la saumure d'Epoisses, nous avons pu calculer la perte en calcium soluble : elle est de l'ordre de 21 mg par kg de fromage.

3 - Migration d'autres minéraux

Parmi les minéraux restants, l'évolution de la teneur en magnésium a été étudiée. Les pertes ont pu être estimées et sont très faibles : de l'ordre de 0,024 mg par kg de fromage. Néanmoins, ce n'est pas un élément à négliger, il a un rôle dans la texture de la pâte semblable à celui du calcium.

4 - Migration des matières azotées et du lactose

Il y a perte d'azote total et de lactose, mais il est difficile de calculer ces quantités, les microorganismes de la saumure intervenant à ces niveaux. Néanmoins, pour la lactose, on constate une augmentation de son taux dans les saumures. Il semblerait que cette perte des fromages en lactose, soit proportionnelle à l'enrichissement en acide lactique (acidité Dornic des saumures.)

5 - Migration du sel

Le sel pénètre dans le fromage sous forme d'ions sodium Na^+ et chlore Cl^-. Dès le début du saumurage, on constate une augmentation de la teneur en Na^+ et Cl- (52). Le sodium se concentre d'abord dans les couches externes et se répand ensuite, progressivement, vers le centre.

Environ 10% du sodium total se lie avec les protéines au début du saumurage. Par la suite, on observe une diminution régulière de sodium fixé.

La quantité de sel pénétrant dans un kg de fromage a pu être estimée à 1,6% dans les conditions normales de saumurage.

Conclusion :

Il résulte de ces observations que la notion de vieillissement des saumures correspond à une augmentation de leur taux d'impuretés. Celles-ci se chargent, à la suite des passages successifs de fabrication fromagère, de différents éléments tels que : acide lactique, matières azotées, sels minéraux.

Ces diverses impuretés sont apportées par le fromage mais aussi par l'eau et le sel. Lorsque leurs concentrations s'élèvent, elles peuvent être à l'origine directe de défauts du fromage, comme par exemple l'apparition de goûts indésirables (amertume). Indirectement, elles constituent un milieu de culture favorable au développement de microorganismes variés qui contribuent à accélerer le processus de "vieillissement".

C'est surtout cet aspect du problème que nous allons examiner en comparant l'évolution microbiologique d'une saumure d'Epoisses.

II ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DU SALAGE EN SAUMURE

1 - Origine des sels et importance de leur flore bactérienne

Il semble paradoxal que le sel puisse réceler des microorganismes ; il y a quelques années, on y trouvait fréquemment des moisissures, des levures et des bactéries. Actuellement, l'évolution des techniques industrielles de fabrication et de conditionnement des sels s'accompagne d'une amélioration considérable de leur qualité.

Les bactéries qui peuvent se développer à des concentrations salines élevées sont dites halophiles. Parallèlement, certaines bactéries peuvent survivre dans les sels et les saumures, sans pour autant se multiplier, elles sont dites

halotolérantes.

Dans l'ensemble, la microflore du sel des salines renferme près de 70% de Micrococques et 20% de Corynebacteria. Le groupe Bacillus représente seulement 4% de l'ensemble, le reste étant constitué de Flavobacteria, d'autres bactéries et levures (83).

Néanmoins, les sels raffinés obtenus par évaporation sous vide, conditionnés en sacs de polyéthylène, ne sont pas exempts de germes revivifiables, mais le nombre de microorganismes est généralement très faible.

2 - Microbiologie des sels et des saumures

La saumure étant constituée initialement de sel et d'eau, la flore microbienne sera, non seulement fonction des apports en microorganismes de ces 2 constituants, mais aussi des soins apportés dans la fabrication des fromages, dans la préparation des saumures et dans l'entretien des salles de salage.

-a) apports dus au sel

. bactéries chromogènes halophiles du "rouge"

L'un des caractères qui frappe le plus dans ce type de bactéries est la prédominance des organismes pigmentés. Les colonies vont du jaune orangé au violet, en passant par le rose et le rouge carmin.

La coloration varie selon l'espèce, la souche et les conditions ambiantes. Elle est plus intense quand les conditions de culture sont les plus adéquates : milieu plus sec, plus aéré et aussi plus salé.

Ces bactéries appartiennent essentiellement à 2 genres : Halobacterium et Halococcus.

Le genre Halobacterium désigne des bacilles à coloration de Gram négative, dotés du polymorphisme suivant les concentrations salines. Les cellules bactériennes peuvent se lyser quand la concentration en sel est de 5 à 10%. Quant au genre Halococcus, il désigne les cocci à coloration de Gram positive, immobiles, halophiles et qui ne se lysent pas en solutions hypotoniques (10%). Ce genre n'est pas reconnu dans la classification de BERGEY (8), mais recouvre une partie des genres Micrococcus et Sarcina. Il appartiendrait, par conséquent, à la famille des Micrococcaceae.

. Bacillaceae

- Clostridia

On peut également trouver dans les saumures de fromageries ces bactéries anaérobies. les Clostridia sont protéolytiques (putréfiants) et sont capables,à l'état sporulé, de résister à des températures élevées et aux désinfectants les plus actifs.

Ces bactéries peuvent tolérer des concentrations en sel allant de 10 à 12%.

Les principaux types trouvés essentiellement dans le sel marin sont :

- *Clostridium perfringens (le plus fréquent)*
- *Clostridium bifermentans*
- *Clostridium sporogenes*
- *Clostridium butylicum*

La présence de ces bactéries, d'origine tellurique pour la plupart, presque ubiquitaires est normale, étant donné la capacité de formation des spores dans les milieux hostiles.

- Bacillus

Ces bactéries sont aérobies et, également protéolytiques. Elles se trouvent à l'état sporulé dans les principaux sels.

Les principaux types sont :

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*
- *Bacillus megatherium* qui hydrolyse la caséine et peut être un danger en fromagerie car, il peut supporter des teneurs en sel allant de 0 à la saturation.

. Micrococcaeae

- Micrococcus

Ce sont les germes les plus fréquents dans les saumures. Certaines espèces peuvent se développer jusqu'à saturation en sel. On trouve notamment :

- *Micrococcus luteus*
- *Micrococcus varians*

Ces bactéries sont psychrotrophes et peuvent se développer entre -4°C et + 20°C, elles sont aérobies

strictes, oxydantes et non fermentantes.

- Staphylococcus

Leur présence est assez rare dans le sel. Néanmoins, CENTELEGUE J.L., MILLIERE J.B. (12) ont montré que *Staphylococcus aureus* a un taux de survie de 24% au bout de 20 jours dans une saumure saturée à 15°C.

- Sarcina

Elles font partie de la flore halophile et sont fréquentes dans les saumures.

. Enterobacteriaceae

- Coliformes

On trouve surtout *Escherichia coli* qui peut survivre dans les saumures : il est l'indice de contamination fécale récente selon les travaux de BUTTIAUX R. (10).

- Salmonellae

Les Salmonella peuvent être également trouvées dans le sel. Une étude de survie de ces germes, dans la saumure, a été effectuée par SHIPP H.L. (88).

A la température de 20°C, les Salmonella sont tuées dans les saumures contenant 20% de NaCl, mais, à des températures plus basses (entre 5 et 15°C), elles peuvent survivre plusieurs semaines dans des saumures pouvant contenir jusqu'à 30% de sel. On peut également trouver dans les sels d'autres types de bactéries tels Achromobacter, Corynebacterium et quelques Streptocoques du groupe D (en particulier *Streptococcus faecium et Streptococcus faecalis*).

La survie de ces derniers peut être, aussi, très grande, (travaux de RIEMANN) (84) : 3 semaines de survie dans une saumure de 240 g de NaCl pour 74% des cellules bactériennes de *Streptococcus faecalis* ; 87% de ces cellules peuvent survivre 3 semaines à une concentration de NaCl de 170 g/litre.

-b) apports dus à l'eau

L'eau est souvent le facteur contaminant des saumures et peut apporter pratiquement tous les germes précités.

L'eau peut être à l'origine d'une contamination de la saumure par quelques moisissures (Aspergillus, Mucor...), et quelques levures (Torula) qui sont, dans l'ensemble, protéolytiques.

D'où la nécessité de l'emploi d'une eau bactériologiquement pure pour la constitution des saumures.

-c) apports dus aux fromages

Les nombreux passages de fromages dans les saumures (280 unités de 450 grammes par jour et 5 jours par semaine, dans le cas de l'Epoisses, soit au total 630 kg de fromage par semaine), entraînent une augmentation de la charge microbienne de ces dernières et un enrichissement en germes indésirables au cours du vieillissement.

L'apport dû aux fromages (cas des pâtes molles) réside essentiellement :

- en microcoques pigmentés et surtout non pigmentés,
- en coliformes et surtout, *Escherichia coli*
- en moisissures *Aspergillus, Penicillium, Mucor*
- en levures *Saccharomyces et Torula*.

L'apport est évidemment variable suivant les types de fabrication, le lait, l'eau, le personnel et l'atmosphère des locaux.

De plus, l'apport par les fromages de Lactobacillus, tels *Lactobacillus plantarum* qui produit des substances muqueuses, peut entraîner des défauts non seulement dans les saumures (cas des saumures filantes) mais encore sur les fromages (apparition des taches de "rouille").

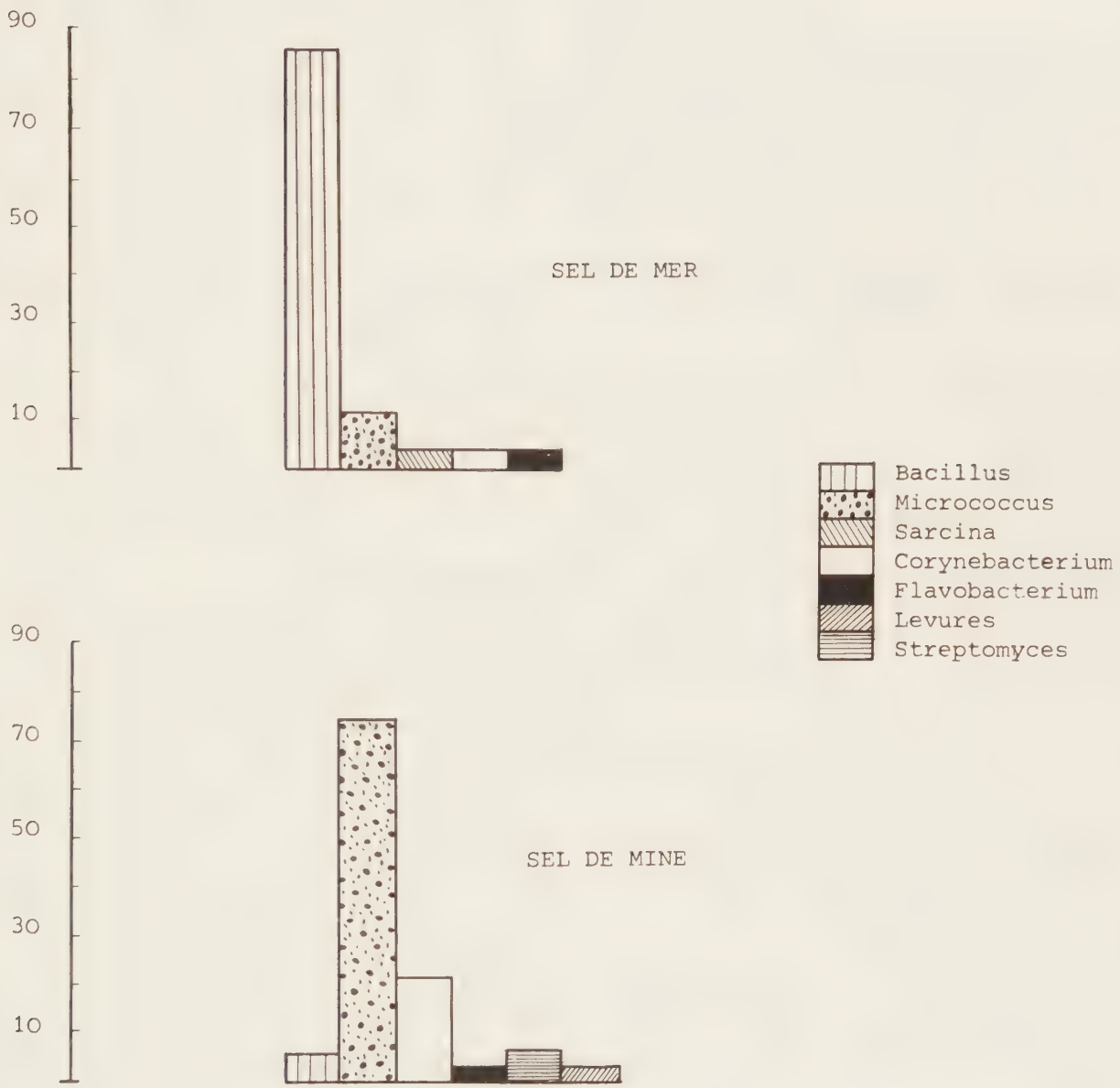
-d) apports dus à l'environnement

L'emploi des sels raffinés et d'eau potable traitée n'est pas suffisant pour obtenir une saumure présentant toutes les qualités hygiéniques requises.

Il nous faut attirer l'attention sur les conditions d'entretien des locaux de salage et des bacs à saumure. En effet, l'environnement agit sur la contamination des saumures par leur teneur en microcoques et moisissures en particulier.

De même, les diverses manipulations sont aussi une source de contamination. L'hygiène et l'état de santé du personnel doivent être examinés avec une attention particulière.

Le tableau n° X montre la répartition des grands groupes bactériens dans un sel de mer et dans un sel de mines (5)



III ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DE LA SAUMURE D'EPOISSES

Après avoir fait ce "tour d'horizon" de nos connaissances sur la microbiologie d'une saumure, en général, nous allons étudier celle du fromage d'Epoisses.

Pour cela, nous avons suivi l'évolution, sur une année, d'une saumure. Malheureusement, nous n'avons pu effectuer ces analyses sur une saumure "neuve" et notre première étude est faite sur une saumure âgée de 3 mois.

1 - Schéma de l'analyse microbiologique de la saumure (41)

Nous avons effectué l'analyse de la saumure directement, en ayant soin, toutefois, pour certaines recherches, de neutraliser celle-ci à pH =7. Nous rappelons brièvement les techniques et recherches qui ont été effectuées :

-a) dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

A partir de la saumure neutralisée, nous avons fait des dilutions de 0 à 10^{-6} et dénombré les colonies sur "Plate Count Agar" après 72 heures à 30°C.

-b) recherche des coliformes totaux

A partir de la saumure neutralisée, des dilutions de 0 à 10^{-3} ont été réalisées. Les ensemencements ont été faits sur :

. milieu liquide : bouillon lactosé bilié au vert brillant avec cloche de Durham (dilution en double),
. milieu gélosé : gélose au désoxycholate lactose (en double couche).

-c) dénombrement des levures et moisissures

Des dilutions de 0 à 10^{-3} ont été ensemencées sur une gélose à la pomme de terre (pH = 4,5). Le comptage des colonies a eu lieu 72 heures après incubation à 20-25°C.

-d) recherche des Streptocoques fécaux

Le test présomptif consiste à ensemencer des dilutions de 0 à 10^{-3} (en double) sur milieu de ROTHE. Si ce

milieu présente, après incubation, un louche microbien, il est repiqué sur milieu de LITSKY (test confirmatif).

-e) dénombrement des anaérobies totaux sporulés

La saumure neutralisée à pH = 7 est chauffée à 75°C pendant 10 minutes. Des dilutions de 0 à 10^{-3} sont ensemencées (en double) sur le milieu de ROSENOW. cystéiné.

-f) recherche des formes végétatives et spores de Clostridia sulfito-réducteurs

A partir de la suspension neutralisée, non chauffée, on ensemence 6 fois 5 ml sur le milieu VL sulfité. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, les Clostridia sulfito-réducteurs donnent des colonies entourées d'un halo noir volumineux.

-g) dénombrement des Staphylocoques et autres bactéries halophiles

Se référer à la technique utilisée pour les fromages.

2 - Résultats

R E C H E R C H E S	SAUMURE DE 3 MOIS	SAUMURE DE 15 MOIS
FLORE TOTALE AEROBIE MESOPHILE	264×10^3/ml	60×10^4/ml
COLIFORMES TOTAUX	environ 3/ml	aucune conclusion : trop de variabilité
LEVURES	2×10^3ml	18×10^4/ml
MOISISSURES	2×10^2/ml	5×10^3/ml
STREPTOCOQUES FECAUX	entre 10 et 100 ml	entre 10^3 et 10^4/ml
ANAEROBIES TOTAUX SPORULES	82/ml	entre 10 et 90/ml
CLOSTRIDIA SULFITO-REDUCTEURS	0	6/ml
HALOPHILES	4×10^3/ml	5×10^5/ml dont 40 Staphylocogues/ml

3 - Discussion des résultats

- La flore totale aérobie mésophile est multipliée par 3 sur une durée de 12 mois ce qui n'est pas excessif ;
- les développements les plus marquants sont ceux :
  . des levures
  . des bactéries
  . des Streptocoques fécaux.

Ceci est en rapport direct avec ce que nous avons observé dans l'évolution des microflores interne, mais surtout superficielle des fromages. Il semble donc que les passages successifs des fromages lors du saumurage entraînent un ensemencement important de ces groupes bactériens.

Un essai d'identification de ces souches a permis de conclure qu'elles étaient apportées par les fromages et nous retrouvons les mêmes germes, par exemple :

. *Saccharomyces lactis*,
. *Streptocoques* du groupe D.

Entre ces deux analyses, nous avons remarqué la prolifération d'espèces pigmentées que nous avons prélevées et identifiées. Celles-ci nous ont, en effet, paru intéressantes car leur pigmentation va du jaune, à l'orange, au rouge et rappelle la teinte du fromage d'Epoisses.

4 - Systématique des souches pigmentées isolées de la saumure

A -

ORDRE : MICROCOCCALES
FAMILLE : MICROCOCCACEAE
GENRE : SARCINA (GOODSIR, 1842)

. *Sarcina lutea* (SHROETER,1886)

Habitat : air, sol, eau.

Forme environ 60% de cette flore pigmentée et a été trouvé sur les fromages en voie d'affinage.

Ce sont des cocci de 1, à 1,5 micron de diamètre, en paquets cubiques. Immobile, Gram positif. Aérobie, température optimum 25°C. Hétérotrophe.

Sur gélose inclinée : colonies jaunes, granuleuses, rondes, surélevées, humides, brillantes. Le

bouillon reste clair par dépôt d'un sédiment jaune abondant ; la gélatine est lentement liquéfiée ; le lait est coagulé puis devient alcalin. Les glucides ne sont pas attaqués. Les nitrates sont réduits en nitrites ; il produit H_2S et indole.

. *Micrococcus cryophilus* (Mc LEAN et coll. 1951)

Cocci de 1,6 micron de diamètre moyen, avec de grandes formes de 3, 6 microns et de petites formes de 1 micron, isolés, en grains, courtes chaînettes et amas irréguliers prédominants. Immobile en général. Gram positif, facilement négativé.

Sur gélose, il donne des colonies blanc crémeux.

Aérobie, catalase positive; température optimum 9° mais peut encore croître à -4°C (maximum 23°C) pH optimum 6,8 à 7,2.

La gélatine n'est pas liquéfiée ; le lait est légèrement alcalinisé. Aucun glucide n'est fermenté. L'urée est hydrolysée.

. *Micrococcus cinnabareus* (FLUGGE 1886)

Provient de poussières. Cellules sphériques de 1 micron de diamètre, isolées ou en paires. Immobile. Gram positif (labile). Aérobie. Température optimum 25°C.

Sur gélose : colonies épaisses, saillantes, rose à rouge vermillon ou rouge carmin.

Le bouillon est troublé. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le lait n'est pas modifié. Les glucides sont légèrement fermentés. Les nitrates sont réduits en nitrites.

B -

ORDRE : BACTERIALES
FAMILLE : BACTERIACEAE
GENRE : Brevibacterium (BREED, 1953)

. *Brevibacterium* groupe *ammoniagenes* (COOK et KEITH, 1927)

Isolé des matières fécales et des matières en putréfaction. Bâtonnet de 1,4 micron à 1,8 micron sur 0,8 micron. Isolé. Immobile. Gram positif. Anaérobie facul-

tatif ; température optimum 30°C ; tué à 55°C, pH optimum : 7 à 8,5.

Sur gélose inclinée ; colonies rondes, plates, lisses, grisâtres, parfois jaunâtres. Le bouillon est modérément troublé ; dépôt floconneux. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le lait est légèrement alcalinisé. Les glucides ne sont pas fermentés. Les nitrates sont réduits en nitrites. L'urée est hydrolysée.

. *Brevibacterium erythrogenes*
(LEHMAN et NEUMANN, 1896)

Isolé des eaux, des matières fécales, du lait rouge, des fromages d'Emmenthal.

Bâtonnet de 1 à 1,4 microns sur 0,3 à 0,5 micron, à extrémités arrondies ; isolé ou parfois en chaînettes ou en filaments. Immobile. Gram positif.

Anaérobie facultatif ; température optimum 28° à 35°C.

Sur gélose inclinée : colonies humides, jaune à rouge-orangé. Le bouillon est troublé et devient orangé. La gélatine est liquéfiée. Le lait est lentement coagulé et devient rouge sang ; la caséine est lentement précipitée puis peptonisée ; odeur désagréable. Les glucides ne sont pas fermentés.

Il produit de l'indole (traces), H_2S, NH_3.

Les nitrates sont réduits en nitrites. Le pigment rouge est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme.

C -

ORDRE : BACTERIALES
FAMILLE : BACTERIACEAE
GENRE : Microbacterium (ORLA JENSEN, 1919)

. *Microbacterium flavum* (ORLA-JENSEN 1919)

Isolé de beurre et de fromage. Bâtonnet de 1 à 3 microns sur 0,7 à 0,9 micron, à bouts arrondis. Immobile. Gram positif. Granulations colorables par le bleu de méthylène. Aérobie ; catalase positive ; température optimum 32°C. Résiste à 72°C; Sur gélose au lait : colonies lisses, convexes, couleur crème à jaune canari. La gélatine n'est pas

liquéfiée. Le lait n'est pas modifié. Il fermente : glucose, lévulose, mannose.

D - ORDRE : BACTERIALES
FAMILLE : PSEUDOMADACEAE
GENRE : Empedobacter (BRISOU)

. *Empedobacter aquatile* (FRANKLANT 1889)

Habitat : eau contenant un fort pourcentage de $CaCO_3$.

Bâtonnet de 1 à 3 microns sur 0,5 à 0,7 micron avec formes coccoïdes et formes filamenteuses très longues (10 à 40 microns).

Gram négatif. Immobile. Aérobie ; catalase positive. Température optimum 10 à 30°C, pH optimum 7,0 à 7,2.

Sur gélose inclinée : colonies brillantes, transparentes, jaune clair devenant brun jaunâtre, parfois mucoïdes. Le bouillon est troublé modérément. La gélatine est partiellement liquéfiée après culture et pigmentée en jaune orangé. Le lait est lentement digéré (culture jaune en surface). Il fermente : glucose, galactose, mannose, saccharose et maltose. Il utilise les glucides comme source de C en anaérobiose, de même que glycérol, xylose, arabinose; lévulose, cellobiose, lactose et raffinose. Il produit des traces d'H_2S.

. *Empedobacter ferruginum* (SICKLES et SHAW 1934)

Habitat : sol

Bâtonnet de 0,7 à 1 micron sur 0,5 micron ; isolé ou en paires. Immobile. Gram négatif. Anaérobie facultatif. Température optimum : 35 à 37°C. pH optimum : 7 à 7,5. Sur gélose inclinée : colonies couleur rouille, rondes, ombiliquées, sèches. Le bouillon est troublé. La gélatine est lentement liquéfiée (dépôt jaune). Le lait est coagulé (caillot mou). Il fermente : glucose, lactose, saccharose, maltose, dextrine et inuline ; très lègère attaque du mannitol. L'amidon est activement hydrolysé.

E - ORDRE : ACTINOBACTERIALES
FAMILLE : ACTINOMYCETACEAE

GENRE : Mycoccoccus (KRASSILNIKOV 1938)

. *Mycoccocus capsulatus* variété rouge
(KRASSILNIKOV 1938)

Habitat : sol

Cellules spériques irrégulières de 0,7 à 1 micron de diamètre, souvent en courtes chaînes de 3 à 7 éléments. Capsule épaisse, muqueuse ; chaînettes latérales. Gram positif. Non acido-résistant. Aérobie. Température optimum : 25 à 30°C. Sur gélose ; colonies roses, extensives, mucoïdes ; pas de pigment soluble.

5 - Conclusion

Toutes ces souches ont été, pratiquement, retrouvées sur le fromage en fin d'affinage. Par leur pigmentation, elles contribuent à donner à l'Epoisses sa couleur caractéristique. De plus, le pH du produit affiné étant voisin de 7,5, il convient tout particulièrement au développement de ces germes dont certains sont fortement protéolytiques et, par conséquent, bénéfiques pour l'affinage.

Néanmoins, il y a lieu de surveiller de très près leur prolifération de façon à ce qu'ils n'entraînent pas d'accidents de saumurage.

IV ACCIDENTS DE SAUMURAGE D'ORIGINE MICROBIOLOGIQUE

La saumure, par son utilisation répétée, s'appauvrit en sel et s'enrichit en calcium, acide lactique et lactose. Le calcium agit sur l'acide lactique en formant du lactate de calcium qui augmente le pH et donne un milieu de culture favorable au développement des microorganismes putréfiants et autres bactéries nuisibles. Ceux-ci risquent de contaminer la surface des fromages et de provoquer des accidents et des défauts de croûtage.

Les germes protéolytiques (Bacillus, Saccharomyces et quelques moisissures comme Geotrichum candidum, Mucor etc.) provoquent un ramollissement de la surface du fromage, la croûte devient grasse et dégage de mauvaises odeurs.

Les levures s'accomodent, surtout des milieux acides et peuvent, en se développant, préparer le terrain à des moisissures qui peuvent être protéolytiques et, de ce fait, dégradent la caséine.

C H A P I T R E VII

ASPECTS TECHNOLOGIQUES

I INTRODUCTION

Diminuer ses prix de revient, améliorer et régulariser la qualité de sa production sont deux objectifs que l'industrie fromagère ne peut dissocier.

Dans cette perspective, plusieurs voies d'expérimentation sont actuellement ouvertes, notamment le développement de la mécanisation et l'automatisation, la recherche et la mise au point de levains mieux adaptés aux besoins des fabrications fromagères.

La préparation des caillés tend, en effet, à s'effectuer de plus en plus selon des procédés mécanisés. Ceux-ci présentent des avantages techniques et économiques évidents : diminution sensible des besoins en main d'oeuvre, plus grande régularité dans la qualité des fabrications, réduction des temps technologiques, etc...

Mais, pour certains types de fromages, et notamment les pâtes molles (Epoisses), la mécanisation se heurte à des difficultés inhérentes à la matière même de ces pâtes. En effet, les caillés des pâtes molles doivent leurs caractères typiques au fait qu'ils ne subissent, au cours de leur préparation, qu'un travail mécanique très limité. L'égouttage est donc lent et l'acidification poussée. Une accélération mécanique de l'égouttage tend à se traduire par une insuffisance de l'action microbienne et les fabrications prennent alors un caractère présure trop marqué.

Néanmoins, sans trop chercher à vouloir pousser la mécanisation qui serait alors néfaste dans le cas de l'Epoisses, nous allons étudier les principaux stades de la fabrication et essayer de souligner quelques points dignes d'intérêt pour

une meilleure homogénéisation de la qualité du produit fini.

II QUALITE DU LAIT A L'ENTREE

Maîtriser le substrat, c'est-à-dire le caillé, exige la maîtrise de la coagulation et de l'égouttage. Celle-ci implique, en premier lieu, une qualité de matière première aussi élevée et régulière que possible, d'où la nécessité d'un contrôle sérieux de production et de collecte.

Or, de nombreux problèmes technologiques sont posés à la fabrication du fromage d'Epoisses, les laits n'étant pas standardisés après collecte, mais seulement mélangés de façon arbitraire.

Pour pallier à ces inconvénients, il faudrait une sévère sélection du lait

- éliminer les laits de fin de mammite :, les laits rances et de fin de lactation
- mesurer le pH,
- faire le test de la réductase,
- dénombrer les coliformes, par exemple,
- standardiser la matière grasse et l'extrait sec.

Nous insisterons plus particulièrement sur le degré de pH initial du lait. Il a une grande importance sur la fabrication.

En effet, le pH influe sur l'activité de la présure, modifie la libération des sels de calcium dont dépend la coagulation du lait, change la solution des éléments inorganiques à l'intérieur du coagulum et, de ce fait, la composition du sérum qui s'écoule du caillé. Ce qui revient à dire que la composition du fromage s'en trouve modifiée puisque tout ce qui ne s'écoule pas avec le petit-lait demeure dans le caillé, La proportion de calcium en particulier, mais aussi d'autres constituants, influent considérablement sur la fermeté ou la mollesse du fromage.

Néanmoins, la question de la régulation du pH n'est pas simple. Si on abaisse le degré de pH en introduisant un levain dans le lait, pour un affinage anticipé, on augmente non seulement les chances d'infection pour le bactériophage, mais on détermine aussi, à l'avance, pour une large part, les

taux d'acidité ultérieure. La croissance du levain en vue de donner le degré optimum de pH au départ ne correspond pas toujours, nécessairement, au degré souhaitable pour la meilleure production d'acide pour le cours de la fabrication.

Un autre point nous semble très important : la teneur en microorganismes du lait.

Dans l'ensemble, le fromager ne se contente pas de rechercher un lait pauvre en germes, il le pasteurise. Ceci n'est pas toujours une solution car les bactéries et enzymes du lait cru contribuent parfois à rendre un fromage plus savoureux, mais il arrive qu'elles aient l'effet inverse sans compter le danger des germes pathogènes.

Un procédé relativement récent, permet d'espérer qu'il sera possible de réconcilier le meilleur de la saveur du lait cru (pour autant que cela soit dû à la présence d'enzymes) avec une hygiène poussée. Tel est le procédé de bactofugation : on soumet le lait à une force centrifuge puissante dans une sorte d'épurateur dont le bol est muni d'ouvertures. Lorsque le lait passe dans le bol, environ 1% en est rejeté, ce qui entraîne l'élimination de la plupart des germes (environ 95%).

L'application de ce procédé à l'industrie fromagère a été empêchée car la perte est élevée, la baisse de rendement du fromage étant supérieure de beaucoup à la perte de 1% du lait.

Cependant, en 1970, la compagnie ALFA.LAVAL a mis en application un procédé de stérilisation du produit de bactofugation qui est alors reversé dans le lait, de telle sorte que le rendement demeure inchangé. Une installation de ce type a été mise en service en Finlande pour la fabrication d'un fromage de type Emmental.

III LE CONDITIONNEMENT DES SALLES D'EGOUTTAGE

La maîtrise de la coagulation et de l'égouttage suggère, nous l'avons vu, une préparation convenable du lait mis en fabrication. Traitement thermique, épuration centrifuge, maturation dirigée du lait contribuent à créer les conditions de milieu favorables aux développements microbiens ultérieurs.

D'autres paramètres sont à envisager.

Dans la méthode traditionnelle, la séparation en 2 parties des constituants du lait se produit en 2 temps :

-a) la coagulation au cours de laquelle la caséine est insolubilisée,

-b) l'égouttage au cours duquel le lactosérum se sépare du caillé.

Les facteurs qui influent sur la propriété du caillé et que le fromager peut diriger sont :

- l'acidité du lait à l'emprésurage et son ensemencement (depuis 1973, la société BERTHAUT utilise un levain "Flora Danica" qui semble conférer une meilleurs texture au caillé mais ne semble modifier en rien l'affinage),
- la température dans les salles
- le taux de présure.

Il semble que la fixation de la valeur du pH du lait au moment de la coagulation ait une importance accrue et que quelques 1/10 d'unité pH, en plus ou en moins, puisse modifier sensiblement la qualité du lait. Aussi, pourrions-nous envisager un système de contrôle du pH avant les cuves de maturation pour obtenir une valeur optimale constante, par réinjection d'acide ou de babeurre acide.

La proportion de matière grasse a une influence notable, non seulement sur la texture du caillé mais aussi sur son égouttage. Dans les conditions de fabrication identiques un caillé maigre a toujours une humidité plus élevée qu'un caillé gras, ceci en rapport avec l'affinité de la caséine pour l'eau.

- la température des salles d'égouttage a aussi un rôle très important.

Il est certain que pour obtenir un fromage ayant des caractéristiques constantes en sortie d'égouttage, il ne suffit pas d'augmenter ou de diminuer la température de la salle d'égouttage, pour accélérer ou bloquer la synérèse. Il est nécessaire de disposer d'une installation de conditionnement qui permette d'assurer une homogénéité de température dans le local, installation de chaud et de froid aussi souple que possible et stable.

Pour conduire son égouttage, le fromager doit connaître :

- le pH du sérum qui s'écoule mais, la mesure du pH du fromage égoutté est plus significative. Cette valeur permet de prévoir sa qualité future et d'appliquer des correctives.

Exemple : si l'expérience a montré que pH 5 correspond à une bonne qualité, pH 4,8 correspond à un fromage rèche, d'affinage difficile, et pH 5,2 à un fromage qui risque de s'abîmer par la suite, il restera trop humide et pourra être le siège de fermentations gazeuses et d'une protéolyse trop rapide.

- la teneur en extrait sec total,
- le pourcentage d'humidité,
- la mesure de la quantité de sérum écoulé : on sait en effet que l'objectif, extrait sec constant, qui ne peut d'ailleurs être résolu que par une conduite du poids moyen constant, influe beaucoup sur la valeur gustative du fromage.

Lors de la synérèse, le rôle joué par la membrane filtrante de la molécule de caséine permet dans le temps, un égouttage plus ou moins poussé, une rétention plus ou moins importante de lactose, ce qui conditionnera la fermentation primaire. Cette fermentation primaire se situant jusqu'au niveau du salage ou même légèrement au-delà, est, ou presque, uniquement lactique.

Ceci est une première approche, mais ce n'est pas tout, le contrôle du pH ne représente qu'une partie du problème. En effet, il paraît très aisé d'arriver à un pH optimum, plus ou moins tamponné, mais cette rapidité d'obtention ne correspond généralement pas à un développement poussé de la flore bactérienne par conséquent à une occupation du milieu.

Par ailleurs, l'on sait que certaines bactéries, et tout particulièrement les ferments d'arôme, ont des plages de pH de développement inférieures à pH 5. Ceci veut dire que la régulation de l'égouttage devrait jouer sur des températures régulées par une production donnée, permettant un égouttage normal, jusqu'à pH5, à un abaissement relativement rapide de la température d'égouttage pour permettre alors aux ferments d'arôme de se développer en prenant le dessus sur les ferments lactiques tout en permettant à ceux-ci de poursuivre l'acidi-

fication jusqu'à pH 4,4. Il est évident que ce blocage de température devrait être constant dans le temps (été comme hiver).

IV LE CONDITIONNEMENT DES SALLES DE SALAGE ET LES PROBLEMES POSES PAR LE SALAGE EN SAUMURE

L'importance de l'opération du salage, dans la fabrication des fromages, découle de ses effets multiples qu'il faut rattacher à trois causes principales :

- l'hygroscopicité du sel cristallisé et la forte pression osmotique des saumures provoquent un drainage accru du lactosérum contenu dans la pâte. En outre, les changements de concentration saline modifient l'état d'hydratation des protéines ; il en résulte un complément d'égouttage et la formation de la croûte en est facilitée ;
- le sel modifie fortement le milieu de culture solide qui constitue le caillé égoutté ; il provoque une sélection favorable des microorganismes par suite de l'inhibition d'espèces dangereuses qui ne sont pas halotolérantes. En outre, le sel règle l'activité des enzymes qui concourent à l'affinage et il modifie la solubilité des protéines ;
- le sel apporte le goût salé, et de plus, il influe sur l'équilibre des substances sapides particulières à chaque type de fromage.

Le salage en saumure se répand de plus en plus. Cette méthode permet un salage plus régulier, une diminution de la main-d'oeuvre et elle facilite la rationalisation des fabrications. En contrepartie, son emploi pose des problèmes assez sérieux de maintien de la qualité pendant une durée que l'on souhaite la plus longue possible. Les saumures "vieillissent" vite.

Des études assez nombreuses ont été publiées sur l'évolution de la composition des saumures et sur les méthodes de contrôle (11,56,66,67,68,69). Néanmoins, les points suivants semblent particulièrement dignes de discussion ;

- quelle influence exercent le mode de fabrication et la constitution du jeune fromage sur la vitesse de pénétration du sel ?

- quelle est la vitesse d'absorption ?
- quelle influence exerce la formation de la croûte sur la vitesse de pénétration du sel dans le fromage ?
- quelle influence ont les valeurs du pH ou de l'activité titrable des bains de salage ?
- dans quelle mesure est-il important que les bains de salage aient la même valeur de pH que les fromages ?

Un des problèmes essentiels semble donc être celui de la diffusion du sel et il a été étudié par différents auteurs. En particulier, JAKUBOWSKI et REPS (52) ont cherché à déterminer la "capacité d'absorption du sel" par le fromage de Tilsit, qui intervient comme une constante (D) dans la formule reliant la concentration en sel dans l'extrait sec du fromage (y%) à la concentration de la saumure (C%) et du temps de salage t (secondes) :

$$y = \frac{c}{1 + \frac{1}{D\sqrt{t}}}$$

Le calcul de la constante D est décrit en détail, elle tient compte de la vitesse de diffusion du sel et de la surface relative du fromage moulé.

JAKUBOWSKI a trouvé une excellente corrélation entre les résultats calculés par cette formule et ceux ce l'analyse chimique, dans des conditions variées. Cet auteur estime que la méthode d'étude qu'il a élaborée pour suivre la cinétique de la diffusion du sel a un caractère universel et peut permettre une régulation assez précise du salage.

Des études comparables ont été poursuivies par VUJICIC (96), qui avait pour objectif principal de déterminer le temps de salage pour obtenir une concentration donnée de sel dans le fromage (Q). Les variables sont l'humidité initiale du fromage, le rapport surface/volume et la concentration de la saumure.

La formule s'écrit ainsi :

$$T = \frac{1}{K} \ln \frac{Qm}{Qm - Q}$$

Le temps T est en heures; Qm est la capacité maximale d'absorption en sel, elle est donnée par une autre formule où interviennent l'humidité du fromage et la concentration de la saumure ; k est un coefficient qui tient compte de la surface relative.

L'auteur indique également une excellente concordance entre les résultats expérimentaux et ceux donnés par le calcul.

Les formules ci-dessus représentent une approche intéressante en vue de résoudre le problème de la programmation du salage mais, elles exigent des calculs assez compliqués et la connaissance de coefficients à déterminer préalablement pour chaque type de fromage. Cette complexité des calculs proposés révèle la limite de nos connaissance sur la cinétique de la diffusion du sel.

JAKUBOWSKI et REPS (53) ont encore effectué une étude de la migration de l'eau et des substances minérales au cours du salage. Des fromages de Tilsit de différents fabrications ont été analysés pour la teneur en eau, en cendres (les chlorures étant soustraits); en calcium, en sodium, et en potassium, dans les parties externes, médianes et centrales des fromages, à des intervalles de temps définis au cours du salage et de l'affinage.

Les moyennes analytiques indiquent que l'eau et certaines substances minérales solubles dans l'eau passent du centre du fromage vers l'extérieur, ce qui provoque un appauvrissement du fromage en ce qui concerne ces substances. Par contre, le sodium et le potassium se déplacent dans le sens opposé. Le sodium accumulé dans la couche externe pendant le salage pénètre à coeur, sa concentration devenant égale dans la pâte toute entière. Le potassium qui ne reçoit pas d'apports de l'extérieur est plus concentré dans les parties centrales des fromages. On observe aussi une diminution de la quantité du calcium lié à la phase solide (protéines du fromage), ainsi que l'augmentation passagère de la teneur en sodium et potassium liés de même manière. On suppose que ce fait a quelque rapport avec le phénomène de gonflement des protéines du fromage au cours du salage. Ce phénomène a été étudié par JAKUBOWSKI et coll. (52,53). Le gonflement du caillé de fromage d'Edam et de Tilsit coïncide avec la diffusion du sel

jusqu'à une concentration de 2%. Le volume du caillé revient à celui qu'il avait avant salage 6 jours après sa sortie de saumure.

Autres études sur les conditions favorables au salage

L'influence de la température (de 5 à 20°C) et de la concentration de la saumure (de 18 à 26%) sur la production et la qualité du fromage russe "JAROSLADAV" a été étudiée par ANTIPOVA (4). Avec l'augmentation de la température et de la concentration de la saumure, les pertes totales en poids du fromage augmentent au cours de la fabrication et la qualité du produit baisse. Une technique de salage modifiée par rapport à la technique traditionnelle a été proposée (température 5 - 6°C) (concentration en sel 18%) ; elle permet d'obtenir une pâte plus souple avec un meilleur rendement.

En ce qui concerne l'Epoisses, les problèmes de saumurage sont nombreux et ce, pour plusieurs raisons :

1) La cuve de saumurage est à la température ambiante d'où des écarts de température très importants d'un salage à l'autre. Or, en général, pour les pâtes molles, le salage a lieu à température froide aux alentours de 15°C. Le salage à froid élimine un liquide plus dilué que le lactosérum. En conséquence, la concentration des substances solubles augmente dans la partie aqueuse de la pâte. De plus, la température moyenne de sortie d'égouttage est de l'ordre de 20°C et la température moyenne de ressuyage avant halage est de 14°C. Il faut donc refroidir au niveau du saloir. Dans le cas du salage en saumure, il est beaucoup plus facile de refroidir avec uniformité tous les fromages dans les mêmes conditions. De plus cette action de refroidir est beaucoup plus rapide et efficace qu'un refroidissement par l'air.

2) L'égouttage est irrégulier d'une fabrication à l'autre ce qui implique une hétérogénéité dans le saumurage. En effet, la teneur en eau du fromage au moment du salage a une importance , s'il n'est pas suffisamment égoutté, il prend trop de sel et retient trop d'acide lactique. En conséquence, l'affinage est retardé et le coeur du fromage restera dur.

3) Quatre cents unités de 440 g de caillé sont plongés à la fois dans un bain de saumure de 600 litres pendant 45 minutes. La répartition du sel se trouve ainsi inégale ,

les fromages se trouvant à l'extérieur seront plus salés que ceux qui sont situés au centre des claies.

Il semble qu'il serait souhaitable de moins charger les claies en unités fromages de façon à permettre une meilleure circulation de la saumure et d'augmenter les échanges avec celle-ci.

En conséquence, des essais seraient à tenter semi-industriellement en vue de définir les paramètres souhaitables à une meilleure qualité et homogénéité dans le saumurage :

- influence de la température,
- influence de la concentration de la saumure,
- définition d'un "coefficient de charge" correspondant au rapport poids de $\frac{\text{fromages saumurés}}{\text{poids de saumure}}$

Il serait également intéressant d'abaisser les taux d'impuretés de la saumure par des traitements appropriés (95), ce qui aurait pour conséquence de prolonger son utilisation et d'améliorer sa qualité. Mais, l'application industrielle de ces procédés paraît difficilement réalisable en raison de leurs coûts élevés. Néanmoins, une pasteurisation après décantation et filtration, pourrait être envisagée sans entraîner trop d'incidence sur le coût.

V LE CONDITIONNEMENT DES SALLES DE RESSUYAGE AVANT ENTREE AU HALOIR OU SECHOIR

Bon nombre de fromagers, mal équipés en haloirs, observent des pertes importantes de poids de leurs fromages et ne peuvent rien contrôler sinon que l'apprécier à posteriori. Autrement dit, si par un équipement traditionnel ils sont capables de maintenir une température, ils sont moins capables de régler l'humidité relative, à moins d'avoir recours à des seaux d'eau jetés sur le sol, ce qui n'est pas un moyen rationnel ou industriel.

De plus, les haloirs traditionnels, autres que les caves naturelles subissent les fluctuations de températures extérieures, entraînant des séchages plus ou moins importants selon les saisons.

Il est certainement souhaitable de tabler sur une constante au haloir avec toutefois la possibilité éventuelle de jouer sur le degré hygrométique mais aussi d'assurer une entrée constante de produits au haloir en extrait ou en poids moyen.

Si le contrôle de l'égouttage a été bien mené, le séchage s'en trouvera diminué, ce qui n'en sera que meilleur. Il est toutefois possible de jouer sur une bonne fourchette de perte de poids au séchoir, sans pour autant dépasser un certain pourcentage.

Pour qu'un séchoir à fromages soit parfait, plusieurs règles sont nécessaires :

1) Calorifugeage important des murs et plafonds ; ceci pour que les déperditions maxima n'excèdent pas 6 cal/m^2/h. Il est certain que les pertes par parois (pertes de calories l'été) sèchent les fromages chaque fois que 600 cal. entrent, ce qui correspond à la chaleur latente de vaporisation de 1 kg d'eau. De plus, dans un séchoir mal calorifugé, les piles de fromages situées aux pieds des murs sèchent davantage que celles situées dans le milieu du local. D'où l'intérêt d'avoir un excellent calorifugeage limitant les entrées de calories.

2) La hauteur du séchoir : celle-ci doit être importante, (au minimum 3,20 m), pour permettre de créer au-dessus des fromages, un matelas d'air uniforme qui descend sur les fromages. Dans un séchoir trop petit, l'air sèche davantage les piles du haut que celles du bas.

3) Plan de gerbage des claies : il sera scrupuleusement respecté par les fromagers, au besoin un "parking" sera peint au sol. En effet, la diffusion de l'air étant réglée pour un certain nombre d'allées et une certaine disposition géométrique de gerbage, elle ne devient pas valable pour une autre disposition (courant d'air, dispersion de poids).

Deux solutions peuvent être retenues concernant le temps de séchage : soit un cycle de 20 heures, soit un cycle de 40 heures. Il est certainement préférable de retenir le cycle le plus long possible, ceci de façon à travailler avec une humidité relative plus haute, limitant les actions de dispersion, le risque de croûtage éventuel.

En effet, un fromage qui serait, ou tuilé à l'égouttage, ou ayant subi un séchage trop rapide de la croûte, à un certain moment, présentera une rétention d'humidité ayant pour effet certains troubles lors de l'affinage futur (fromage coulant sous croûte...);

En séchant également à haute humidité, les dispersions de poids seront moins importantes pour un séchage en 48 heures, il sera possible d'envisager un retournement, les fromages du dessus se retrouvant au-dessous et vice-versa. Un séchage de 2 jours permet également de connaître, dès la première journée, par une méthode de laboratoire, l'ex trait sec des fromages à l'entrée au séchoir, compte-tenu d'un objectif bien déterminé à la sortie ; il est donc possible de connaître en fonction du nombre de fromages, le nombre de kilogrammes d'eau à sécher dans le temps, ce nombre de kilos étant programmable sur les régulations.

Au niveau de l'humidité relative, il est évident que ceci est très subjectif, car il est difficile pour un fromager d'afficher exactement l'humidité qu'il faudrait pour atteindre finalement un objectif de perte de poids.

De toute manière , on a intérêt à ce que le séchage se fasse à la plus haute humidité possible, d'où la nécessité d'avoir :

- une grande circulation d'air,
- une homogénéité des temps, températures et humidité,
- de pouvoir limiter cette humidité à une valeur minimum inférieure à ne pas dépasser,
- de pouvoir contrôler et mesurer la quantité d'eau, sur les fromages et ceci à n'importe quel moment.

VI LE CONDITIONNEMENT DES HALOIRS ET DES CAVES D'AFFINAGE

Le but de l'affinage n'est pas seulement la formation de l'arôme et de la saveur, mais aussi d'obtenir une texture désirée et un aspect extérieur typique.

L'affinage est le résultat global de phénomènes variés protéolyse, désamination, décarboxylation, lipolyse et dégradation des acides gras, fermentation de l'acide lactique .

1 - Modifications au cours de l'affinage

Elles se résument ainsi :

- perte d'humidité ou séchage,
- destruction totale du lactose (disparition partielle ou totale de l'acide lactique, élévation du pH),
- solubilisation partielle de la caséine (protéolyse et modification de la texture),
- fleurissement et formation de la croûte,

L'étendue de ces modifications dépend d'un ensemble de conditions physiques et chimiques dont les plus importantes sont celles qui influent sur le développement des microorganismes et sur l'activité des enzymes (pH du fromage, composition de la phase aqueuse du fromage, teneur en sel, température et hygromégrie ambiantes, composition de l'atmosphère).

Le rapport surface-poids est une caractéristique importante également pour les pâtes molles ; en effet, plus le fromage est mince et plus l'affinage est rapide et régulier, même à coeur.

2 - Microflore superficielle des fromages au cours de l'affinage

Si les soins en cave ne s'opposent pas à leur développement, nous avons vu que des microorganismes variés envahissent rapidement la surface du fromage. Il apparaît tout d'abord une microflore acidophile puis, lorsque la surface est neutralisée, les ferments du rouge se développenent à leur tour.

Ces ensemencements naturels ont pour origine la saumure mais aussi l'environnement. De plus, les lavages successifs apportent une flore mais aussi, sélectionnent les germes présents.

3 - Neutralisation de la pâte

En fin d'égouttage, la pâte a toujours une réaction acide. Les pâtes molles ont un pH bas (4,8 pour l'EPOISSES), voisin du point isoélectrique de la caséine qui est de 4,6.

L'acide lactique est neutralisé ou bien disparaît en cours d'affinage de plusieurs manières :

- neutralisation par le calcium resté dans la pâte.
- destruction par les moisissures et les levures superficielles.
- neutralisation par l'ammoniac résultant de la protéolyse.

Le pH du fromage remonte au cours de l'affinage et les pâtes molles peuvent même devenir alcalines (Epoisses : p H : 7,4).

4 - Proteolyse

-a) solubilisation de la caséine

C'est le phénomène le plus important de l'affinage car il affecte, à la fois, la texture et la saveur.

Dans le fromage égoutté, il y a 4 à 8% de substances azotées solubles dans l'eau. A la fin de l'affinage, cette proportion s'élève entre 20 et 50%. La pâte devient plus molle et onctueuse. Il y a apparition de substances aromatiques par la dégradation de la caséine (acides aminés).

-b) protéase des fromages

Les protéases des microorganismes de la flore superficielle jouent un rôle dans l'affinage des fromages à pâte molle. La solubilisation progresse de l'extérieur vers l'intérieur.

La vitesse de protéolyse dépend des facteurs principaux suivants :

- la température : à basse température, la solubilisation de la caséine est lente,
- la vitesse : elle est plus rapide en début d'affinage qu'à la fin, plus rapide si l'humidité du fromage est élevée (des fromages très égouttés ont un affinage lent),
- la caséine : elle est solubilisée plus rapidement dans les fromages maigres que dans les fromages gras,
- la présure : plus la dose est élevée, plus la solubilisation est poussée,
- le sel : plus le taux est élevé, plus la protéolyse ralentit.

Nous venons de faire un bref rappel des principaux

phénomènes qui amènent un caillé au stade produit fini avec toutes ses caractéristiques.

Il semble très difficile, sur un tel fromage, d'intervenir à ce stade et de stopper le développement d'une microflore aux dépens d'une autre. Mais, afin de mieux contrôler le développement microbien et la production d'enzymes, nous retrouvons les facteurs bien connus : température, humidité, et pH du milieu.

C O N C L U S I O N

Cette étude de la microflore du fromage d'Epoisses a fait ressortir l'importance de deux étapes technologiques : le salage et les lavages successifs. Ces deux opérations sont déterminantes dans la conduite du processus d'affinage.

Le salage entraîne une diminution de la microflore totale, des Streptocoques, des Lactobacilles. Il sélectionne donc les microorganismes présents et permet l'implantation d'une flore originale, caséolytique dans l'ensemble et pigmentée. L'origine de ces souches pigmentées (*Sarcina lutea*, *Brevibacterium*, *Empedobacter*, *Mycococcus*, *Microbacterium* etc...) est, sans conteste, la saumure et, pour une moindre part, l'environnement.

Les lavages, à leur tour, bouleversent l'équilibre des microflores implantées. En particulier, à la surface du fromage, ils stimulent le développement des Microcoques et des levures. La pigmentation s'accentue.

Néanmoins, vers le 25ème jour de maturation, les levures cessent de se multiplier, se lysent et libèrent dans le milieu des facteurs stimulant le développement et l'activité des Microcoques, ceci entraîne une augmentation très marquée du pH et de la pâte.

La diversité et la densité du peuplement microbien contribuent, assurément, au goût et à la texture typiques du fromage d'Epoisses.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude des microorganismes pigmentés et de déterminer leur potentiel enzymatique et la nature de leurs pigments. En effet, ils semblent participer à l'affinage en même temps qu'à la "pigmentation" du fromage.

Le "vieillissement" de la saumure, lié à l'enrichissement en impuretés chimiques et en microorganismes, est, également, une étape qui mériterait une étude plus approfondie.

Nous avons essayé de faire un tour d'horizon des problèmes microbiologiques et de souligner les points qui nous ont paru dignes d'intérêt pour une meilleure qualité.

Les critères qui nous ont fait choisir ce fromage comme matériel de travail, sont autant de paramètres qui nous ont gênés dans cette étude, car rien n'est standardisé, mais, également, nous ont passionné malgré la complexité de l'ensemble du processus.

Nous n'avons pas eu la prétention de dominer l'évolution de ce fromage car être en mesure de contrôler, d'orienter les phénomènes biologiques et biochimiques qui sont responsables de cette évolution, c'est être capable de maîtriser les développements microbiens et enzymatiques. Or, cette maîtrise exige le contrôle du peuplement microbien originel des caillés ; cela pose le problème des levains, de la flore du lait mis en fabrication, de la flore des sels et des saumures, des eaux et de l'environnement.

C'est naturellement la flore des levains, qui en premier chef, doit assurer le peuplement microbien optimal du caillé. Ceci n'est pas chose facile et il se pose à ce niveau un problème du choix des microorganismes, choix des espèces et choix des souches.

La maîtrise de l'action des agents de l'évolution du fromage suppose le contrôle du développement des microorganismes et de l'action des enzymes. Les développements microbiens commandent, en effet, la production d'enzymes extracellulaires ; ils déterminent, finalement, le stock enzymatique disponible.

Les facteurs de la vie microbienne sont bien connus, les uns sont liés aux conditions extérieures, l'aération, l'hygrométrie, la température ; ils peuvent être assez facile-

ment contrôlés. D'autres sont liés aux conditions de milieu : teneur en eau, en sel, pH, richesse en substances nutritives, oligo-éléments et facteurs de croissance. Ces derniers sont plus difficiles à contrôler. La richesse en substances nutritives disponibles, en facteurs de croissance et en oligo-éléments est réglée, en partie, par la composition du lait mis en oeuvre et par la technique de préparation du caillé.

Il est, cependant, probable que la qualité du fromage, en tant que milieu de culture, est surtout déterminée par les actions enzymatiques et les excrétions ou lyses microbiennes qui se manifestent en son sein. Ainsi, la libération de composés azotés solubles par action de microorganismes caséolytiques a un effet favorable sur le développement des bactéries lactiques. Il a été également établi que certaines levures excrètent dans les milieux de culture des substances activant la croissance des Microcoques.

Ces effets nous rappellent qu'au sein des fromages en voie de maturation dont le peuplement, nous l'avons vu, est à la fois très dense et très diversifié, les associations microbiennes se traduisent par un comportement des microorganismes qui n'est pas celui d'une culture pure et là sont les difficultés. Par exemple, dans un fromage dont la teneur en sel dépasse 6% dans la phase aqueuse, les Streptocoques lactiques en association survivent et même se multiplient, alors qu'en bouillon lactosé, en culture pure, ils supportent difficilement 3 à 4% de sel.

Contrôler le développement microbien et la production d'enzymes n'est pas suffisant ; il faut, aussi, maîtriser l'action de ces enzymes et là encore, nous retrouvons les facteurs bien connus, température,pH et humidité du milieu. On sait, par exemple, que les températures de maturation sont très inférieures aux températures optimales de l'action enzymatique surtout pour les pâtes molles. En fait, la maturation d'un fromage représente un processus enzymatique constamment réfréné. Sans doute pourrait-on augmenter la température pour accélérer l'affinage mais il y a des limites car une élévation de température trop importante se traduit par une diminution de qualité.

L'action enzymatique est également réfrénée et contrôlée par le pH du milieu. Les variations de pH de la pâte ont naturellement des répercussions sur l'action enzymatique et, par suite, sur l'évolution du fromage.

L'action des enzymes dépend aussi de la structure physico-chimique du substrat. Mais, dans ce domaine, on ne dispose que de données partielles et imprécises. Il est cependant certain que le degré de dispersion de l'eau, la structure de la matière grasse, l'état de la caséine ont une influence sur l'action enzymatique.

La maturation des fromages est donc un processus trop complexe pour qu'il soit facile de la maîtriser. La nature du substrat, le nombre et la variété des agents responsables de son évolution, la diversité des modifications subies par les constituants, la variété des produits formés, tout cela contribue à rendre difficile une réelle connaissance, une réelle maîtrise de l'affinage.

Néanmoins, pour notre part, deux possibilités concrétisées ne manqueraient pas d'être facteurs de progrès :

- une meilleure définition du peuplement microbien optimal devrait faciliter la mise au point de levain adapté, capable de conférer à la pâte texture, saveur et arôme appropriés ;

- la mise au point de méthodes d'analyses objectives permettrait d'apprécier, de quantifier la qualité du type de fromage, de définir son degré optimal de maturation, de caractériser un seuil de qualité minimal, de reconnaître un défaut.

Mais, quels que soient le traitement initial du lait et le procédé de préparation du caillé, la maturation s'effectuera pièce par pièce. Le fromager devra donc chercher à assurer au sein de chaque unité un peuplement et un développement microbien appropriés en vue de créer les activités enzymatiques responsables de l'affinage. Finalement, chaque exemplaire de fromage représente une unité biologique autonome, une sorte de "micro-usine" chargée de produire les enzymes qui sont

nécessaires à sa propre évolution.

On conçoit qu'un tel mode de travail rende difficile une production de masse de qualité uniforme. Mais, actuellement il n'existe guère d'alternative. Mettre en oeuvre des méthodes d'affinage plus rationnelles, susceptibles d'accroître et de régulariser la production, est sans doute possible. Nous pensions, par exemple, à l'emploi d'enzymes microbiennes produites industriellement. Mais dans l'état actuel des connaissances, une telle modification des conditions de la maturation conduirait à l'obtention de produits nouveaux.

Conserver aux divers fromages leurs caractères typiques et introduire des modes de fabrication permettant de mieux contrôler et orienter les processus biochimiques de l'affinage supposent encore une meilleure compréhension du phénomène.

B I B L I O G R A P H I E

(1) ADES G.L. et CONE J.F. (1969) - Proteolytic activity of Brevibacterium linens during ripening of Trappist type cheese *J. Dairy Sci* - V 52 , N 7, p. 957-961.

(2) ALFORD J.A. et FRAZIER W.C. (1950) - Effect of micrococci on the developpment of flavour added to Cheddar cheese made from pasteurized milk . *J. Dairy Sci*, 33, P 115-120.

(3) ALIFAX R. (1972) - Activité lypolytique de quelques micro-organismes (1er bactéries). *Le lait* , 515-516, p. 283-296

(4) ANTIPOVA G. (1966) - Effects of different salting procedures on cheese quality and yield. Asbtr : Dairy Sci, *Abstracts*, 28,12.

(5) BAIN N. et coll; (1957) - The bacteriology of salt used in fish curing. In "*the microbiology of fish and meat curing brines*" p. 1 (Her Majest's Stationary Office ed.) London, 336 p.

(6)BAIRD-PARKER A.C. (1963) - A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests *J. Gen. Microbiol.* 30, p. 409-427

(7) BARIBO L.E. et FOSTER E.M. (1952) - The intracellular proteinases of certain organisms from cheese and their relationship to the proteinases in cheese.*J. Dairy Sci*, 35, p. 149-160.

(8) BEECH F.W., DAVENPORT R.R., GOSWELL R.W., et BURNETT J.K. (1968) - Two simplified schemes for identifying yeast cultures. In "*Identification methods for microbiologists* Part B, Technical series 2, Academic Press, London

(9) BREED R.S., MURRAY D.G.D. et HITCHENS A.P. (1948) Bergey's

Manual of determinative Bacteriology, 6ème éd., The Williams and Wilking Co, Baltimore

(10) BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A. (1969) - Manuel de techniques bactériologiques, 3ème éd. Ed. médicales Flammarion, Paris

(11) CENTELEGUE J.L., MILLIERE J.B., VEILLET L. et WEBER F. (1971) - Aspects phusico-chimiques et microbiologiques du salage en saumure des pâtes molles moisies . *La Technique Laitière*, 26, 708, p. 13-19.

(12) CENTELEGUE J.L., MILLIERE J.B., VEILLET L., et WEBER F. (1971) - Etude de survie de quelques souches bactériennes dans la saumure . *Travaux de l'Ecole Supérieure de Laiterie de Nancy.*

(13) CHAPMAN G.H. (1945) - The signifiance of sodium chloride on studies of Staphylococci - *J. Bact.* 50, 201

(14) CHARPENTIER Cl. et BERGERET J. (1972) - Mise au point d'une méthode normalisée pour l'étude du métabolisme des glucides, appliquée aux levures du genre Saccharomyces , I.I.A. V.89, N 7-8.

(15) DALE G. et GUILLOT J. (1971) - Contribution à l'étude de la microflore du fromage de Saint-Nectaire et de la physiologie du Geotrichum candidum Link. C.R. *Soc. Biol.* 165, n° 2, p. 309-316.

(16) DALE G. (1972) - Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire *Rev. lait. franç.* N. 296, p. 199-203.

(17) DAVIES R. (1963) - Microbial extracellular enzymes, their uses and some factors affecting their formation. In RAINBOW C., ROSE A.H., *Biochemistry of industrial microorganisms*, 68-150, Academic Press, New-York.

(18) DAVIS J.G. (1965) - Cheese Vol 1. Basic Technology Vol 2. Annotated bibliography with subject index J. et A.

Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London

(19) DAY E.A. (1967) - Cheese flavour-*Symposium on foods of the Oregon state University*, 4, p. 331-361.

(20) DELESPAUL G., GUEGUEN M., et LENOIR J. (1963) - La flore superficielle des fromages de Saint-Nectaire et de tomme de Savoie. Son évolution au cours de l'affinage *Rev. lait. Franç.* N 313, p. 715-729.

(21) DE MAN J.C., ROGOSA M., et SHARPE M.E. (1960) - A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23, p. 130-135.

(22) DESMAZEAUD M., et HERMIER J. (1968) - Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez Micrococcus caseolyticus. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 8, (3), p. 419-429.

(23) DESMAZEAUD M., et HERMIER J. (1968) - Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de Micrococcus caseolyticus *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 8 (4), p. 565-577.

(24) DESMAZEAUD M. et DEVOYOD J.J. (1970) - Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 10 (3), p. 413-430

(25) DESMAZEAUD M. et HERMIER J. (1972) - Isolement et détermination de la composition qualitative des peptides issus de la caséine stimulant la croissance de Streptococcus thermophilus. *Eur. J. Biochem* 28, p. 190-198

(26) DEVOYOD J.J., BRET G. et AUCLAIR J.E. (1968) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. I Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage *Le Lait* N. 479-480, p. 613-629

(27) DEVOYOD J.J. (1969) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. II Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, N 481-482, p. 20-39.

(28) DEVOYOD J.J. et MULLER M. (1969) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. III Les streptocoques lactiques et les Leuconostoc. Influence de différents microorganismes de contamination. *Le Lait*,N 487, p. 369-399.

(29) DEVOYOD J.J. (1969) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV Les entérocoques. *Le Lait*,N 489-490 p. 637

(30) DEVOYOD J.J. (1970) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. V Les Lactobacilles. *Le Lait*,N 495-496, p. 277-284

(31) DEVOYOD J.J. et DESMAZEAUD M. (1970) - Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis à vis des streptocoques lactiques et des Leuconostoc. *Le Lait*, N 497, p. 374-389.

(32) DEVOYOD J.J. et SPONEM D. (1970) - La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI Les levures. *Le Lait*, N. 498, p. 524-543.

(33) DEVOYOD J.J. (1970) - Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. II Action de Penicillium roqueforti sur l'évolution de la flore microbienne. *Le Lait*, N 499-500, p. 644-653.

(34) DEVOYOD J.J. et DESMAZEAUD M. (1971) - Les associations microbiennes dans le formage de Roquefort. III Action des entérocoques et des levures fermentant le lactose vis à vis des Lactobacilles. *Le Lait*, N 507, p. 399-415.

(35) DEVOYOD J.J., DESMAZEAUD M., ASSENAT L. et AUCLAIR J. (1972 Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. IV Action inhibitrice des microcoques caséolytiques sur l'ouverture du caillé. *Le Lait*,N 515-516, p. 297-310.

(36) DUCASTELLE A. et LENOIR J. (1965a)- Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. *Le Lait*,N 447, p. 371-378.

(37) DUCASTELLE A. et LENOIR J. (1965 b) - Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. II Ses espèces dominantes. *Le Lait*, N 448, p. 509-518.

(38) DUCASTELLE A. et LENOIR J. (1969) - Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. III Son activité protéolytique. *Le Lait*, N 489-490, p. 615-636.

(39) DUCLAUX E. (1883) - Principes de laiterie, Paris

(40) FLUCKIGER E., SCHILT P. et LOWE A. (1972) - Contribution à l'étude de la composition de fromages à pâte molle fabriqués en Suisse. *Le Laitier romand*, V 48, N 63, p. 491-492.

(41) FONTAINE F. et LUQUET F.M. (1971) - Schéma de l'analyse bactériologique d'un fromage à pâte molle. *Rev. lait. franç.*, N 292, p. 811-817.

(42) FREUDENREICH (1901) - *Revue générale du lait*

(43) FRIEDMAN M.E., NELSON O. et WOOD W.A. (1953) - Proteolytic enzymes from Bacterium linens. *J. Dairy Sci.*, N 36, p. 1124.

(44) GABILLET Cl. (1972) - Contribution à l'étude des saumures de fromagerie. *Thèse Docteur Ingénieur Université de Dijon.*

(45) GALZIN M., GALZY P. et BRET G. (1970) - Etude de la flore de levure dans le fromage de Roquefort. *Le Lait*, N. 491-492, p. 1-37.

(46) GUERAULT A.M. (1966) - La fromagerie devant les techniques nouvelles.Editions SEP, Paris.

(47) HARPER W.J. (1970) - The effect of starter microorganisms on the manufacture and ripening of selected Italian cheeses. *Milchwissenschaft*, 25 (1), p. 14-18.

(48) - HIRSCH A., CLINTOCK M.C. et MOCQUOT G. (1952) - Observations on the influ ence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyere cheese on the developpment of anaerobie sporeformes. *J. Dairy Sci.*, 191, p. 179-186.

(49) - ISHIDA Y. et FUJII T. (1970) - Isolation of halophilic and halotolerant bacteria from solar salt. *Bull. of Japan Soc. of Sc. Fisheries*, V 36, N 4, p. 391-396.

(50) JACQUET J. et STEEG L. (1953) - Les microcoques de la flore superficielle des fromages à pâte molle C.R. Ac. Sc.,N 237, p. 767-768.

(51) JACQUET J. et LENOIR J. (1969) - Mécanismes intimes de l'affinage des fromages. *Economie et médecine animales*, 10ème année, N 1, p. 38-71.

(52) JAKUBOWSKI J. et REPS A. (1966) - Beitrag zur Kenntnis des Salz absorptions. Vermögen von Käse. *Milchwissenschaft*, N 19, p. 413-417.

(53) JAKUBOWSKI J. et REPS A. (1966) - Die durch des Salzen hernorgerufene Migration von wasser und Mineralstoffen im Käse. XVIIème *Congrès International de Laiterie de Münich*, D, p. 365-372.

(54) KELLY C.D. (1937) - The microbiological flora on the surface of Limburger cheese. *J. Dairy Sci.*,N 20, p. 239-246.

(55) KELLY C.D. et MARQUARDT J.C. (1939) - The influence of hydrogen ion concentration and salt on the surface of Limburger cheese. *J. Dairy Sci.* N 22, p. 309-320.

(56) LACRAMPE J.L., HARDY J. et RAMET J.P. (1971) - Contribution à l'étude de l'évolution chimique et du traitement des saumures de fromagerie. *Le Lait*, V 51, N 503-504, p. 158-175.

(57) LECOQ R. (1965) - Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles, Ed. Doin, Paris.

(58) LENOIR J. (1962) - La flore microbienne du camembert et son évolution au cours de la maturation. *C.R. Acad. Agric.* N 48, p. 692.

(59) LENOIR J. et AUBERGER B. (1966) - Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type camembert. *C.R. XVIIème Congrès International de Laiterie*, D, p. 595.

(60) LENOIR J. et CHOISY C. (1971) - La maîtrise de l'évolution des fromages. *La Technique laitière*. V 26, N 721, p. 47-48.

(61) LODDER J. et KREEGER VAN RIJ N.J.W. (1970) - The yeasts. A taxonomic study. 1 vol. North Holland publishing Company, Amsterdam.

(62) HABBITT L.A. et ZIELINSKA M. (1956) - The use of a selective medium for the enumeration of Lactobacilli in Cheddar cheese. *J. Appl. Bact.*, 19 (1), p. 95-101.

(63) HAIR-WALDBURG H. et HEFELE B. (1971) - Questions sur le rôle de la teneur en sel de cuisine dans le fromage. *La Technique Laitière*, V 26, N 694, p. 14-15.

(64) MANOLKIDIS G., POLYCHRONIADOU A. et ALICHANIDIS E. (1970) - Variations dans la composition du fromage "Télémé" au cours de sa maturation. *Le Lait*, N 491-492, p. 38-47.

(65) MANOLKIDIS G., POLYCHRONIADOU A. et ALICHANIDIS E. (1970) - Observations suivies sur la protéolyse pendant la ma-

turation du fromage "Télémé". *Le Lait*, N 493-494, p. 128-135.

(66) MANSOUR A. et ALAIS C. (1971) - Le mécanisme du salage des fromages en saumure. *Revue laitière française*, N 290, p. 641-645.

(67) MANSOUR A. et ALAIS C. (1972) - Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. I Aspect biochimique : évolution de la composition du fromage et rendement. *Le Lait*, V. 52, N 518, p. 515-535.

(68) MANSOUR A. et ALAIS C. (1972) - Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. II Evolution chimique de la saumure. *Le Lait*, N 519-520, p; 642-653.

(69) MANSOUR A. et ALAIS C. (1973) - Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. III Aspect bactériologique. *Le Lait*, V 53, N 523-524, p. 137-145.

(70) MARTH E.H. (1963) - Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese rigening. A review. *J. Dairy Sci.*, N 46, p. 869-890.

(71) MASSON A. (1970) - La flore microbienne du Vacherin Mont-d'Or. *Mittelunger aus dem gibiete der lebensmitteluntersuchung und hygiene* (Bern), V 61, N 3, p. 260-266.

(72) MAZE P. (1910) - Technique fromagère. Ann. Inst. Pasteur

(73) MOULIN G., GALZY P. et PERRON G. (1973) - Etude de quelques souches de levures isolées du fromage. *Le Lait*, V 53, N 525-526, p. 237-245.

(74) ORLA-JENSEN S. (1906) - Rev. Gén . du Lait.

(75) PAULE R. (1971) - Contribution à l'étude biochimique du genre Lactobacillus, par une méthode normalisée. *Thèse Pharmacie Université Claude Bernard, LYON*

(76) PETERSON M.H., JOHNSON M.J. et PRICE W.V. (1948) - Proteinases content of Cheddar during making and ripening. *J. Dairy Sci.* 31, p. 55-61.

(77) PLUME C. (1968) - Le livre du fromage. 1 vol. Editions des deux Coqs d'Or, Paris.

(78) POZNANSKI J., LENOIR J. et MOCQUOT G. (1965) - La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le Lait*, N 441-442, p. 3-26.

(79) PREVOT A.R. (1961) - Traité de systématique bactérienne. 2 vol. Dunod Edit., Paris.

(80) PURKO M., NELSON W.O. et WOOD W.A. (1951) - The associative action between certain yeasts and Bacterium linens. *J. Dairy Sc.*, N 34, p. 699.

(81) RAIBAUD P., MOCQUOT G. et KOSIKOWSKI F.V. (1959) - Mise en évidence dans certains fromages de systèmes enzymatiques actifs sur la tyrosine. *Ann. Technol. Agric.*, 8, 117.

(82) REITER B. et SHARPE M.E. (1971) - Relationship of the microflora to the flavour of Cheddar cheese. *J. Appl. Bact.*, 34 (1), p. 63-80.

(83) RIBEIRO A.M.R., STOCKER M.Z. et TROPA E. (1968) - Flore bactérienne du sel portugais, son importance pour les industries de conserves alimentaires. *Ann. Inst. Pasteur de Lille.*

(84) RIEMANN M. (1957) - The survival of some D Streptococci in Ham curing brines. In "*the microbiology of fish and meat curing brines*", p. 263.(Her Majesty's Stationary Office ed.) London.

(85) SCHMIDT J.L. et LENOIR J. (1971) - Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques *Le Lait*, N 518, p. 536-537.

(87) SCOTT R. (1972) - The cheese process. I Microbiology and enzymology. *Process biochemistry (London)*, V 7, N 6, p. 33-36.

(88) SHIPP H.L. (1957) - Survival of Salmonella enteridis in brine. In "*Microbiology of fish and meat curing brines*" p. 277. (Her Majesty's Stationary Office Ed.) London.

(89) SOZZI T.; SHEPERD D. et CLELAND M. (1972) - Evolution de la composition chimique et de la flore microbienne du fromage de Vacherin au cours de la maturation. *Le Lait*, V 52, N 513-514, p. 203-219.

(90) SOZZI T. (1972) - Etude sur la préparation de ferments lactiques très actifs. *Le Lait*, V. 52, N 517, p. 454-465

(91) SOZZI T. et MARET R. (1973) - Etude sur la microflore lactique du fromage "Vacherin Mont d'Or". *Le Lait*, V 53, N 525-526, p. 280-294.

(92) - TOKITA F. et HOSONO A. (1968) - Studies on and behaviour of amines produced by Brevibacterium linens. *Milchwissenschaft*, V 3, N 11, p. 690-693.

(93) TOOLENS H.P. et KONING-THEUNE W. (1970) - A selective medium for the detection of Brevibacterium linens in cheese. *Milchwissenschaft*, V 5, N 2, p. 79-83.

(94) TOURNEUR C. (1972) - Aptitude à la protéolyse des Lactobacilles présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie. *Le Lait*, V 52, N 513-514, p. 149-174.

(95) VIARD M. et DEVEAU J. (1972) - Epuration chimique et stérilisation microbiologique par traitement thermique des saumures utilisées dans l'industrie alimentaire et en particulier dans l'industrie fromagère. *Le Lait*, V 52, N 511-512; p. 21-27.

(96) VUJICIC I.F. (1963) - A study on the relationship between the factors influencing the time of cheese salting. *Milchwissenschaft*, N 18, p. 282-284.

(97) WICKERHAM L.J. et BURTON K.A. (1948) - Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J. Bact.*, N 56,

p. 363-371.

(98) WICKERHAM L.J. (1951) - Taxonomy of yeasts. *Technical Bulletin U.S. Department of agriculture*, 1029.